

Universitätsklinikum Essen
Medizinische Fakultät der Universität-Gesamthochschule
Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Humangenetik

Deletionen und Insertionen des RB1-Gens bei Patienten mit Retinoblastom:
Mutationsspektrum, Entstehungsmechanismen und Genotyp-Phänotyp Beziehungen

Inaugural – Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Philipp Moritz Albrecht
aus Köln
2006

Dekan: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. K.-H. Jöckel
1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. D. Lohmann
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H. Esche
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. P. Propping, Bonn

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Juli 2006

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Originalartikeln veröffentlicht:

- 1) Albrecht, P., Bode, J., Buiting, K., Prashanth, A. K., and Lohmann, D. R. (2004): Recurrent deletion of a region containing exon 24 of the RB1 gene caused by non-homologous recombination between a LINE-1HS and MER21B element. J Med Genet, 41, e122.
- 2) Albrecht, P., Ansperger-Rescher, B., Schüler, A., Zeschnigk, M., Gallie, B., and Lohmann, D. R. (2005): Spectrum of gross deletions and insertions in the RB1 gene in patients with retinoblastoma and association with phenotypic expression. Hum Mutat, 26, 437-445.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden auf der folgenden wissenschaftlichen Tagung als Poster vorgestellt:

- 1) Albrecht, P., Gallie, B. L., Lohmann, D. (2003): Identifikation of whole-exon RB1 gene deletions in patients with retinoblastoma. Poster auf der 14. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik.

Für meine Eltern

1. Einleitung

1.1	Hintergrund.....	1
1.1.1	Klinik des Retinoblastoms.....	1
1.1.2	Therapie und Nachsorge.....	1
1.1.3	Zweittumoren.....	2
1.1.4	Genetik des Retinoblastoms.....	3
1.1.5	Das RB1-Gen.....	4
1.1.6	Das Genprodukt, pRB.....	5
1.1.7	Mutationen des RB1-Gens bei Patienten mit Retinoblastom.....	6
1.1.8	Genotyp-Phänotyp Korrelationen.....	8
1.1.9	Identifikation von RB1-Gen Mutationen bei Patienten mit Retinoblastom.....	9
1.2	Zielsetzung.....	10

2. Material und Methoden

2.1	Material.....	12
2.1.1	Chemikalien.....	12
2.1.2	Enzyme und Reaktionskits.....	12
2.1.3	Geräte	12
2.1.4	Amplifikations- und Sequenzierungsprimer.....	13
2.1.5	Patienten und Proben.....	16
2.2	Methoden.....	16
2.2.1	Präparation von DNA aus Tumorgewebe.....	16
2.2.2	Präparation von DNA aus Blut	17
2.2.3	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	18
2.2.4	Polymerase Chain Reaction (PCR).....	18
2.2.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	19
2.2.6	Quantitative Multiplex-PCR (QMPX-PCR).....	19
2.2.7	Automatisierte Kapillarelektrophorese.....	22
2.2.8	Bestätigungsmethoden.....	23
2.2.8.1	Genomische Realtime-PCR	23

2.2.8.2	Longrange-PCR.....	26
2.2.8.3	Longrange-PCR mit drei Primern.....	29
2.2.8.4	Gelelution und Sequenzierung.....	29
3.	Ergebnisse	
3.1.	Quantitative Multiplex-PCR (QMPX-PCR).....	32
3.1.1	Kontrolle und Änderungen des Protokolls der QMPX-PCR.....	32
3.1.2	Verbesserung des Auswertungsalgorithmus für die QMPX-PCR.....	34
3.1.3	Analysen zur Bestätigung der QMPX-PCR-Ergebnisse.....	37
3.2	Entwicklung eines Algorithmus zum Screening auf RB1 Mutationen.....	39
3.3	Identifikation von Mutationen bei Patienten mit Retinoblastom.....	40
3.3.1	Deletionen des gesamten RB1-Gens.....	42
3.3.2	Deletionen mit einem Bruchpunkt im RB1-Gen.....	43
3.3.3	Deletionen mit beiden Bruchpunkten im RB1-Gen.....	43
3.3.4	Duplikationen von Teilen oder des ganzen RB1-Gens.....	48
3.4	Genotyp-Phenotyp Korrelationen.....	49
3.4.1	Anteil der Patienten mit Nachweis konstitutioneller konstitutioneller <i>gross deletions</i>	49
3.4.2	Phänotyp bei Patienten mit zytogenetisch erkennbaren und submikroskopischen Ganzgendeletionen.....	49
3.4.3	Phänotypanalyse bei Patienten mit <i>gross deletions</i> mit definierten Bruchpunkten im RB1 Gen.....	50
3.4.4	Analyse der Verteilung der Bruchpunkte von <i>gross deletions</i> im RB1- Gen.....	52
4.	Diskussion	
4.1	RB1-Mutationsspektrum bei Patienten mit Retinoblastom und Genotyp- Phänotyp-Beziehungen (Albrecht et al. 2005)	54
4.2	Mechanismen der Entstehung von <i>gross deletions</i> (Albrecht et al. 2004).....	57
4.3	Verteilung und mögliche Entstehungsmechanismen der Bruchpunkte von <i>gross deletions</i> im RB1-Gen.....	60
4.4	Nutzen für die Patienten durch verbesserte Analysestrategie.....	62
5.	Zusammenfassung	65
6.	Literaturverzeichnis	66
7.	Anhang	
7.1	Abkürzungen und Glossar.....	73

7.2	Danksagung.....	75
7.3	Lebenslauf.....	76
7.4	Kopien der veröffentlichten Arbeiten.....	77
7.4.1	Albrecht et al., 2004	
7.4.2	Albrecht et al., 2005	

1. EINLEITUNG

1.1 Hintergrund

1.1.1 Klinik des Retinoblastoms

Das Retinoblastom ist der häufigste maligne Augentumor im Kindesalter. Die Inzidenz dieses Tumors beträgt circa 1/15.000 bis 1/20.000 Neugeborene (Suckling et al., 1982). Das Erstsymptom ist meist eine bei einfallendem Licht weißlich erscheinende Pupille (Leukokorie). Dieses Zeichen wird durch die intraokulären Tumormassen verursacht, die das einfallende Licht reflektieren. Bei einem Viertel der neu diagnostizierten Patienten führt neu aufgetretener Strabismus zur Diagnose eines Retinoblastoms. Das Schielen ist Folge der Verdeckung der Fovea Centralis, dem Punkt des schärfsten Sehens. Dadurch kommt es zu einer exzentrischen Fixation oder die Fixation wird unmöglich. Ein sekundäres Glaukom, eine Uveitis oder Glaskörperblutungen sind intraokuläre Komplikationen des Retinoblastoms, jedoch nur selten die ersten klinischen Zeichen dieses Tumors.

Bei 60 % der Kinder ist nur ein Auge betroffen (unilaterales Retinoblastom), bei 40 % tritt das Retinoblastom in beiden Augen auf (bilaterales Retinoblastom). Die meisten bilateral betroffenen Kinder entwickeln mehrere Tumorherde in beiden Augen (multifokal bilaterales Retinoblastom). Dagegen ist multifokales Tumorwachstum bei nur einseitig betroffenen Kindern vergleichsweise selten. Eine besondere Manifestation ist das trilaterale Retinoblastom. Diese Diagnose bezieht sich auf einen histologisch dem Retinoblastom ähnlichen Hirntumor, das Pinealom. Dieser Tumor betrifft meist Kinder mit beidseitigem Retinoblastom. Die Prognose von Kindern mit trilateralem Retinoblastom ist ungünstig, da der Tumor frühzeitig in den Liquorraum metastasiert.

Das Retinoblastom ist eine Erkrankung, die fast ausschließlich im Kindesalter auftritt. Die Diagnose wird überwiegend innerhalb der ersten 2 Lebensjahre gestellt. Bilaterale Retinoblastome werden durchschnittlich 10 bis 12 Monate früher diagnostiziert als unilaterale (Draper et al., 1992; Vogel, 1954).

1.1.2 Therapie und Nachsorge

Die Wahl der therapeutischen Maßnahmen richtet sich nach Größe, Ausbreitung und Lokalisation der Tumoren. Augenerhaltende Therapiekonzepte umfassen Zerstörung durch Hitze (Lichtkoagulation), Kälte (Kryokoagulation) oder Bestrahlung (perkutan oder Brachytherapie). Größere Tumoren oder Tumoren mit Invasion von Nervus Opticus oder anderen extraokulären Strukturen machen eine Enukleation (vollständige Entfernung des Augapfels) erforderlich. Bei extraokulärem Wachstum wird zusätzlich eine adjuvante Chemo-

therapie eingesetzt. Mit neueren Therapiekonzepten wird der Erhalt des Auges durch den Einsatz neoadjuvanter Chemotherapie in Kombination mit nachfolgender augenerhaltender Licht- oder Kryokoagulation angestrebt (Bornfeld et al., 1997; Gallie et al., 1996).

Die Prognose von Patienten mit zum Behandlungszeitpunkt ausschließlich intraokulärem Tumorwachstum ist mit einer 5-Jahres Überlebensrate von über 90 % gut (Rubin et al. 1985). In fortgeschrittenen Stadien mit Metastasierung dagegen versterben die meisten Patienten an der Erkrankung (Schvartzman et al., 1996). Deshalb ist die frühzeitige Diagnose eines Retinoblastoms für die Prognose und optimale Therapie entscheidend. Bei Patienten mit bilateralem Retinoblastom besteht ein Risiko von 25%, bis zum Alter von 6 1/4 Jahren einen neuen Tumorherd zu entwickeln (Abramson und Servodidio, 1992). Bei Patienten mit isoliert unilateralem Retinoblastom liegt das Risiko erheblich niedriger. Vor allem bei augenerhaltender Therapie wurden jedoch auch hier bis zu einem Alter von ca. 7 1/2 Jahren erneute Retinoblastome beobachtet (Abramson et al., 1994). Aus diesem Grund müssen bei allen behandelten Patienten, sowie bei Kindern mit erhöhtem Risiko aufgrund einer Retinoblastomerkrankung in der Familie engmaschige ophthalmologische Vorsorgeuntersuchungen durchgeführt werden.

1.1.3 Zweittumoren

Patienten mit Retinoblastom haben ein erhöhtes Risiko für Tumoren außerhalb des Auges (Zweittumoren). Dazu gehören maligne Weichteil- und Knochentumoren, das maligne Melanom und Malignome des Hirns und der Meningen (Eng et al., 1993). Das Risiko, an Zweittumoren zu erkranken, ist bei bilateral betroffenen Patienten erheblich höher, als bei Patienten mit einseitigem Retinoblastom. Von besonderer Bedeutung ist, dass bei Patienten mit beidseitigem Retinoblastom, die eine perkutane Strahlentherapie erhalten haben, die Sterblichkeit an Zweittumoren im Vergleich zu nicht bestrahlten Patienten nahezu verfünffacht ist. Zweittumoren treten bei diesen Patienten vornehmlich in bestrahltem Gewebe auf (Abramson et al., 1984). In Anbetracht dieser Spätfolgen hat die Entwicklung neuer Therapiekonzepte vor allem die Vermeidung einer perkutanen Strahlentherapie zum Ziel.

1.1.4 Genetik des Retinoblastoms

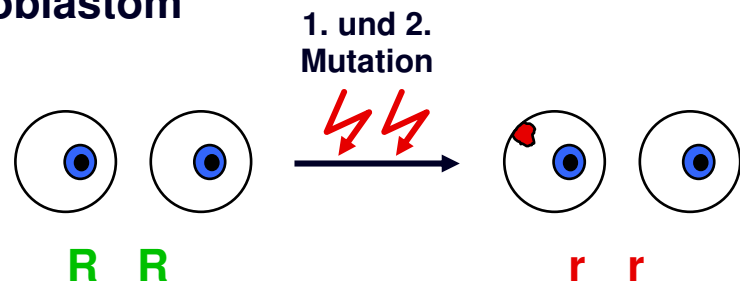
Etwa 10% der Patienten haben Angehörige, die ebenfalls an diesem Tumor erkrankt sind (familiäres Retinoblastom, Draper et al., 1992; Briard-Guillemot et al., 1974). In diesen Familien zeigt das Retinoblastom einen autosomal dominantem Erbgang (Vogel, 1979). Die erbliche Form dieses Tumors ist jedoch nicht auf Patienten mit familiärem Retinoblastom beschränkt. Nahezu alle Patienten mit sporadisch bilateralem Retinoblastom haben ebenfalls eine Disposition zum Retinoblastom, die sie als autosomal dominant erbliches Merkmal an ihre Nachkommen weitergeben können. Von den 60% der Patienten mit sporadisch einseitigem Retinoblastom haben nur 15% ein erbliches Retinoblastom. Den meisten sporadisch einseitigen Erkrankungen liegt also keine erbliche genetische Ursache zugrunde.

1971 stellte Knudson seine Zwei-Schritt Hypothese vor, welche die genetische Grundlage des erblichen und nicht-erblichen Retinoblastoms erklärt. Danach wird die Entstehung sowohl des erblichen als auch des nicht-erblichen Retinoblastoms durch zwei Mutationsereignisse ausgelöst (Abb. 1):

- Bei der nicht erblichen Form des Retinoblastoms gehen der Entstehung eines Tumorherdes zwei Mutationen voran. Diese Veränderungen sind auf somatische Zellen beschränkt.
- Die erbliche Disposition zum Retinoblastom wird durch eine Mutation verursacht, die über die Keimbahn vererbt werden kann. Die Entstehung eines Tumorherdes bei Mutationsträgern wird durch eine zweite Mutation in einer somatischen Zelle der Retina ausgelöst.

Die Zwei-Schritt Hypothese konnte durch die Ergebnisse molekulargenetischer Analysen bestätigt werden (Horsthemke et al., 1987; Lee, W. H. et al., 1987; Fung et al., 1987; Dunn et al., 1989; Yandell et al., 1989). Diese Analysen haben gezeigt, dass die zwei Mutationen, die für die Entstehung eines Retinoblastoms erforderlich sind, die beiden Allele eines autosomalen Gens betreffen, das die Bezeichnung Retinoblastomgen (RB1) erhielt.

Nicht erbliches Retinoblastom



Erbliches Retinoblastom

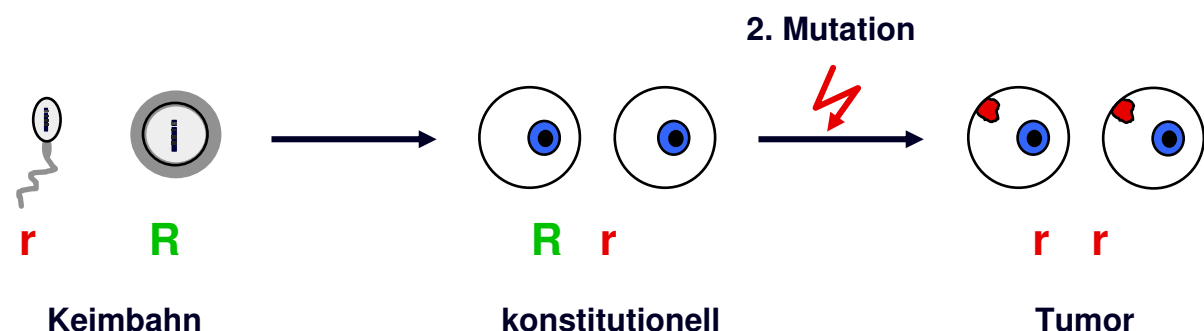


Abb. 1: Nach der Knudson'schen Zwei-Schritt-Hypothese sind für das Entstehen eines Retinoblastoms zwei Mutations-Ereignisse notwendig. Beim nicht erblichen Retinoblastom liegen in konstitutioneller DNA zwei normale Allele vor (R) und beide Mutationen treten in somatischen Zellen auf (mutierte Allele sind durch ein r gekennzeichnet). Beim erblichen Retinoblastom trägt eines der Allele bereits in der Keimbahn eine Mutation, so dass zur Tumorentstehung ein zusätzliches somatisches Mutationsereignis genügt. Infolge unabhängiger zweiter Mutation entstehen meist mehrere Retinoblastome in beiden Augen.

1.1.5 Das RB1-Gen

Erste Hinweise auf die Lokalisation des RB1-Gens im Genom hatten schon zytogenetische Analysen gegeben. Diese zeigten bei einigen Retinoblastompatienten Deletionen im Bereich des langen Arms eines Chromosoms 13 (Knudson et al., 1976). Durch die Analyse von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLPs) konnte die Lokalisation des RB1-Gens auf die Bande 13q14 eingeeengt werden (Cavenee et al., 1983). Die Sequenz dieses Gens (Retinoblastomgen, RB1) wurde 1986 identifiziert (Friend et al., 1986). Die Identifikation von intragenen Mutationen in Tumormaterial (Fung et al., 1987; Lee, W. H. et al., 1987; Bookstein et al., 1988) bestätigte die krankheitsursächliche Bedeutung dieses Gens. Stanbridge belegte 1990 die Funktion des RB1-Gens als Tumorsuppressorgen, indem er die Unterdrückung des Tumorphänotyps von Tumorzellen mit homozygoter RB1-Mutation durch Transfektion klonierter Wildtyp-RB1-cDNA nachwies (Stanbridge, 1990).

Die Auswirkung einer Mutation des RB1-Gens ist von der Spezies abhängig. Beim Menschen hat die heterozygote Inaktivierung des RB1-Gens eine Disposition zur Entwicklung von

Retinoblastomen zur Folge. Mäuse mit dem gleichen Mutationsstatus entwickeln dagegen keine Retinoblastome sondern multiple Tumoren des Intermediärlappens der Hypophyse (Hu et al., 1994) und, mit geringerer Penetranz, medulläre Schilddrüsenkarzinome (Williams et al., 1994). Mäuse mit homozygoter Deletion des RB1-Gens (Knockout-Mäuse) versterben noch *in utero* infolge schwerer Störungen der Hämatopoese und der Neuronen-Entwicklung. Dies deutet auf eine Rolle von pRB in der Embryogenese hin (Lee, E. Y. et al., 1992; Jacks et al., 1992; Clarke et al., 1992; Wang, 1997).

Das RB1-Gen umfasst 27 Exons und erstreckt sich über 183 kb genomischer DNA-Sequenz (McGee et al., 1989; Toguchida et al., 1993). Davon werden ca. 4,7 kb transkribiert (T'Ang et al., 1989; Friend et al., 1987; Lee, W. H. et al., 1987). Der offene Leserahmen reicht von Exon 1 bis Exon 27 und umfasst etwa 2,7 kb, die in ein in verschiedenen Spezies hochkonserviertes Protein translatiert werden. Das 3'-Ende des Transkripts umfasst 2 kb an nicht-translatierter Sequenz.

Das RB1-Gen wird in allen bisher untersuchten Zellen exprimiert. Wie für *housekeeping* Gene typisch, ist die CpG-Insel am 5'-Ende des Gens nicht methyliert (Greger et al., 1989). Im Promoter finden sich keine der typischen, als Bindestellen für transkriptionsaktivierende Faktoren fungierenden TATA- oder CAAT-Elemente (T'Ang et al., 1989; Hong et al., 1989). Es konnte gezeigt werden, dass für die Regulation der Transkription des RB1 Gens Sp1- und ATF-Elemente im Promoterbereich verantwortlich sind (Sakai et al., 1991).

1.1.6 Das Genprodukt, pRB

Das RB1-Gen kodiert ein aus 928 Aminosäuren bestehendes nukleäres Phosphoprotein (pRB) von 110 kD (SDS-PAGE im hypophosphorylierten Zustand, Lee, W. H. et al., 1987). Die am besten untersuchte Funktion des pRB ist die Kontrolle der Progression des Zellzyklus von der G1 in die S Phase. pRB wird vor dem Eintritt in die S-Phase phosphoryliert (Mihara et al., 1989; Buchkovich et al., 1989; Chen et al., 1989; Ludlow et al., 1989). Dies geschieht durch Cyclin-abhängige Kinasen (CdKs) (Lees et al., 1991). Im hypophosphorylierten Zustand bindet pRB E2F Transkriptionsfaktoren. Nach Cyclin-abhängiger Phosphorylierung von pRB wird E2F freigegeben. Dieses kann nun die Transkription von S-Phase Genen aktivieren. So stimuliert E2F die Transkription seines eigenen Gens und die verschiedener Cycline (G₁/S-Cyclin und S-Cyclin). Diese Cycline aktivieren wiederum die Cyclin-abhängigen Kinasen S-CdK und G₁/S-CdK, die ihrerseits weiteres pRB phosphorylieren. Dies führt durch Freigabe von E2F zu Verstärkung im Regelkreis (positive Rückkopplung). Des Weiteren inaktivieren S-CdK und G₁/S-CdK ihre eigenen Inhibitoren, Hct1 und p27, durch Phosphorylierung. Am

Ende der Mitose wird pRB dephosphoryliert und damit E2F reprimiert. Insgesamt steuert pRB, vermittelt durch E2F, den G₁/S-Übergang (Weinberg, 1995). Zusätzlich kann pRB noch andere Transkriptionsfaktoren binden und dadurch auch Aktivierung vermitteln (Kim et al., 1992).

Da pRB eine zentrale Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus spielt, ist es nicht verwunderlich, dass dieses Protein ein Angriffspunkt verschiedener Onkogene ist. So binden die viralen Onkoproteine E1a (des Adenovirus) und T-Antigen (von SV40) an die A/B Domäne des pRB und verhindern so die Bindung von E2F (Ludlow et al., 1989; Whyte et al., 1988; DeCaprio et al., 1988). Die zellulären Oncoproteine Mdm-2 und c-Abl hemmen Funktionen des pRB-E2F Komplexes durch Bindung an C-terminale Domänen des Proteins (Hiebert, 1993; Welch und Wang, 1993; Xiao, Z. X. et al., 1995).

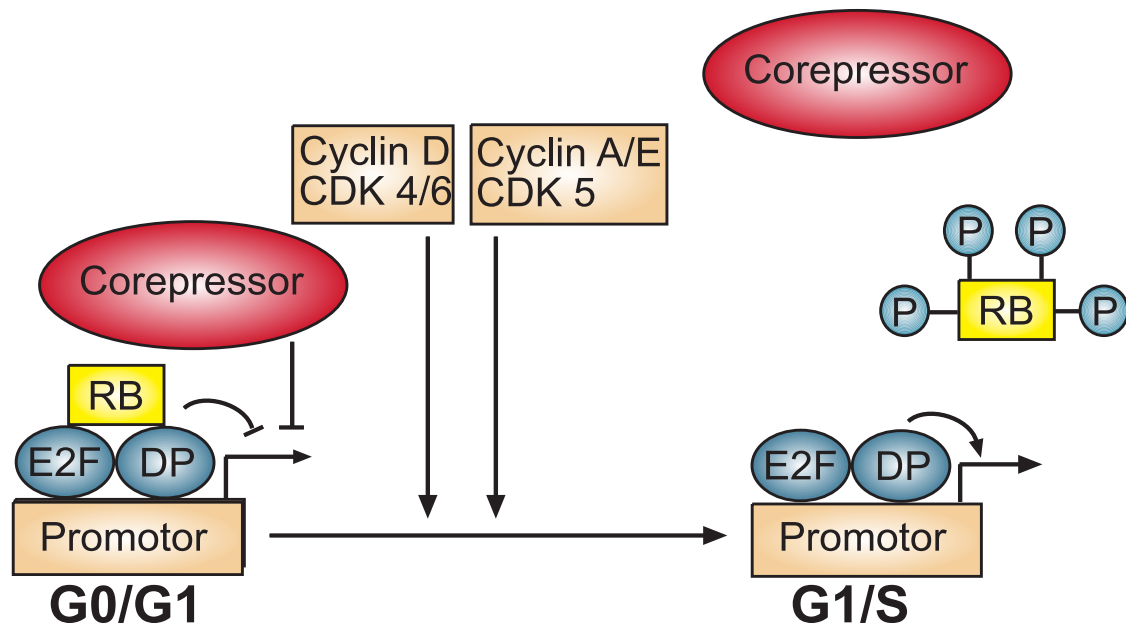


Abb. 2: Im unphosphorylierten Zustand bindet pRB an den Transkriptionsfaktor E2F und seine DP-Untereinheit und verursacht so die Hemmung der Transkription von E2F abhängigen Genen. Dies geschieht durch Hinzuziehen Chromatin-remodellierender Komplexe, die als Corepressoren fungieren. Bei dem Übergang von der G1 in die S Phase wird pRB von den Cyclin-abhängigen Kinasen CDK2, CDK4 und CDK6 phosphoryliert, wodurch die hemmende Funktion von pRB aufgehoben und die Transkription von E2F stimulierten Zielgenen aktiviert wird.

1.1.7 Mutationen des RB1-Gens bei Patienten mit Retinoblastom

Das Spektrum der konstitutionellen Mutationen (in DNA aus Körperzellen, z.B. Blutlymphozyten in heterozygotem Zustand nachweisbar), die überwiegend in der Keimbahn eines Elternteils neu entstanden sind (germinale Mutationen), unterscheidet sich von dem der somatischen Mutationen, die nur in Tumor-DNA identifiziert werden (siehe 1.1.4).

Spektrum der germinalen RB1-Gen Mutationen bei Patienten mit Retinoblastom

- ***Punktmutationen***

Einzelbasensubstitutionen stellen mit 42% und kleine Längenalterationen mit 26% den größten Teil der in konstitutioneller DNA von Patienten mit erblichem Retinoblastom nachweisbaren Mutationen des RB1-Gens (Lohmann, 1999). Mutationen dieses Typs wurden in Exons 1 bis 25, den flankierenden Intronbereichen sowie im Promotorbereich dieses Gens identifiziert.

- ***Umfangreiche Deletionen und Insertionen („gross deletions“, wörtlich übersetzt „grobe Deletionen“)***

Deletionen von mehr als 20 bp machen circa 15 % der konstitutionellen Mutationen im RB1-Gen aus (Richter et al., 2003; Houdayer et al., 2004). Diese Mutationen werden in der Human Gene Mutation Database (www.hgmd.org) unter dem Begriff *gross deletions* zusammengefasst, und auch in der vorliegenden Arbeit so bezeichnet. Bei 8 % der bilateral und 5 % der unilateral betroffenen Patienten sind die Deletionen so ausgedehnt, dass sie in zytogenetischen Analysen peripherer Blutlymphozyten zu erkennen sind (Lohmann, 1999).

Spektrum der somatischen RB1-Gen Mutationen in Retinoblastomen

In DNA aus Tumormaterial sind zum einen die Mutationstypen feststellbar, die auch in konstitutioneller DNA zu finden sind. Es kommen jedoch noch zwei Formen von Mutationen hinzu, die ausschließlich in Tumormaterial zu beobachten sind:

- ***Verlust konstitutioneller Heterozygotie***

Bei über 60% der Retinoblastome ist das zweite Mutationsereignis, das der Entstehung des Tumors vorausgeht, mit einem Verlust konstitutioneller Heterozygotie (*loss of heterozygosity*, LOH) polymorpher Loci auf Chromosom 13 verbunden. Dieser Allelverlust kann durch Deletion oder durch chromosomale Mechanismen wie mitotische Rekombination oder Nondisjunction verursacht werden (Cavenee et al., 1983; Zhu et al., 1992; Hagstrom und Dryja, 1999).

- ***Epigenetische Mutationen***

In 10% der Tumoren ist eine Methylierung des am 5' Ende des Gens gelegenen und normalerweise unmethylierten CpG-Islands nachweisbar. Die Hypermethylierung der Promoterregion führt zur Unterdrückung der Transkription und damit zum Funktionsverlust des betroffenen Allels (Greger et al., 1989; Ohtani-Fujita et al., 1997; Klutz et al., 1999).

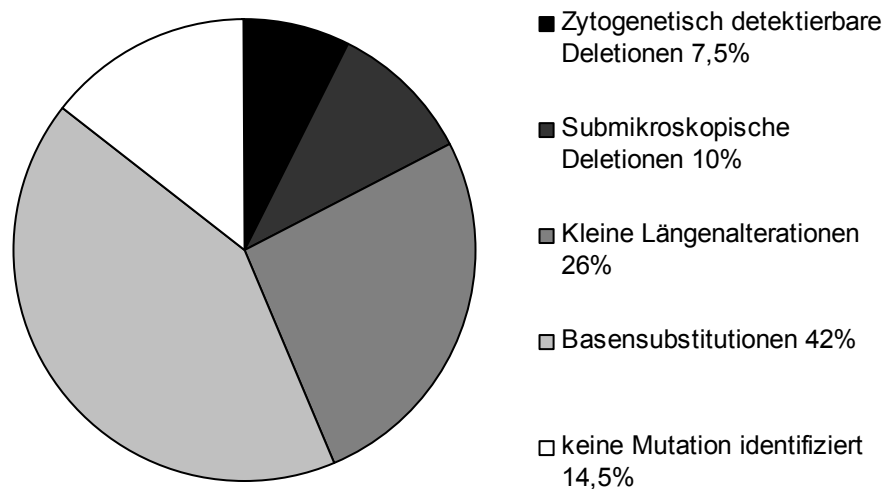


Abb. 3: Anteile verschiedener Mutationsarten am Spektrum konstitutioneller Mutationen des RB1 Gens (Lohmann et al., 1999). Als submikroskopisch werden durch Southern Blot Hybridisierung detektierte Deletionen bezeichnet, die nicht in einer konventionellen Chromosomenanalyse erkennbar sind.

1.1.8 Genotyp-Phänotyp Korrelationen

Träger einer onkogenen Mutation im RB1-Gen haben eine Disposition zur Entwicklung von Retinoblastomen. Die Ausprägung der Erkrankung, d.h. die Zahl der entstehenden Tumore, wird von genetischen und nicht-genetischen Faktoren beeinflusst. Unter den genetischen Faktoren hat die funktionelle Auswirkung der RB1 Gen-Mutation den größten erkennbaren Einfluss.

- Mutationen des RB1-Gens, die mit einem Verlust der Funktion des pRb verbunden sind, führen überwiegend zu beidseitigem Retinoblastom. Zu diesen Mutationen zählen insbesondere Nonsense-Basensubstitutionen und kleine Längenmutationen, die zu einer Verschiebung des Leserasters (frameshift) mit vorzeitigem Stopp-Kodon führen. Auch Mutationen der Splice-Signale der Exon-Intron-Exon Übergänge können durch Störung des korrekten Splicemusters ein vorzeitiges Stopp-Kodon herbeiführen.
- Kleine Deletionen, die den Leserahmen intakt lassen (in-frame-Deletionen), oder Basensubstitutionen, die zu einem Aminosäureaustausch im pRb führen (Missense-Mutationen) haben oft ein milderer Krankheitsbild zur Folge: Heterozygote Mutationsträger sind oft nur einseitig an Retinoblastom erkrankt (mildere Expressivität) oder es tritt kein Retinoblastom auf (unvollständige Penetranz). Für die Genotyp-Phänotyp-Beziehung ist auch die Lokalisation der Mutationen innerhalb des

RB1-Gens relevant. In-frame-Deletionen, welche die funktionellen A/B Pocket-Domänen des pRB intakt lassen, sind häufiger mit milderer Expression assoziiert, als solche, die diese Regionen verändern (Lohmann und Gallie, 2004).

Zytogenetisch detektierbare Deletionen des langen Arms von Chromosom 13, die zu einem Verlust des RB1-Gens führen sind gesondert zu betrachten. Je nach Ausdehnung der Deletion kommt es durch diese Veränderungen zu einem hemizygoten Verlust benachbarter Gene. Diese übergreifenden Störungen führen zum 13q- Deletionssyndrom. Dieses ist klinisch durch unterschiedliche Auffälligkeiten wie niedriges Geburtsgewicht, psychomotorische Retardierung, Hypotonie und Mikrozephalie gekennzeichnet. Bei einigen Patienten werden zusätzlich zu Neuralrohrdefekten, Herzfehler und genitoanale Anomalien sowie Störungen des Knochenbaus beobachtet (Allderdice et al., 1969; Brown et al., 1995).

1.1.9 Identifikation von RB1-Gen Mutationen bei Patienten mit Retinoblastom

Zur Erkennung von Mutationen im Retinoblastomgen werden verschiedene Verfahren eingesetzt. Bedingt durch den Stand der Methodenentwicklung konnten zunächst nur große Strukturanomalien mittels zytogenetischer Analysen und, nach der Identifikation des RB1-Gens, mit Southern-Blot-Hybridisierungen nachgewiesen werden. Diese machen jedoch weniger als 20 % der RB1-Mutationen aus (Horsthemke et al., 1992). Zudem ist die Southern-Blot Analyse aufgrund des hohen DNA-Verbrauchs und auch wegen der aufwändigen Methodik zur Analyse größerer Patientenkollektive nicht gut geeignet.

Um die anteilmäßig wichtigste Gruppe von Veränderungen – Punktmutationen in den kodierenden Bereichen (27 Exons) und den flankierenden Intronabschnitten – aufzuspüren, wurden verschiedene Suchverfahren (Mutations-Screening) etabliert:

- Bei der ***Multiplex-Fragmentlängenanalyse*** werden Exon-Abschnitte mit fluoreszenzmarkierten Primern in Multiplex-PCR Sets koamplifiziert und die PCR-Produkte dann mittels hochauflösender Elektrophorese aufgetrennt (Lohmann et al., 1995). Diese Methode erlaubt die Erkennung kleiner Längenalterationen.
- ***Heteroduplexanalyse*** und ***Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSCP)*** machen sich das unterschiedliche Laufverhalten von mutationstragenden und nicht mutierten doppel- (*Heteroduplexanalyse*) beziehungsweise einzelsträngigen (*SSCP*) DNA-Molekülen in der Gelelektrophorese zunutze (White et al., 1992; Lohmann et al., 1993). Durch beide Methoden können Punktmutationen identifiziert werden. Die Sensitivität der Methoden (geringer Anteil falsch negativer Befunde) hängt jedoch sehr von einer optimalen Etablierung ab. Insbesondere für die SSCP müssen die

Bedingungen der Elektrophorese (Pufferzusammensetzung, Temperatur) für jedes Fragment angepasst werden.

- ***Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC)***. Das Prinzip der *DHPLC* beruht darauf, dass unter bestimmten Bedingungen (Lösungsmittelkonzentration, Temperatur) Heteroduplex-DNA (ein DNA-Strang mit Normalsequenz und ein Strang mit veränderter Sequenz) eine im Vergleich zu Homoduplex-DNA verschiedene Bindungsaffinität zu der verwendeten Chromatographiematrix haben können. Die Auswertung erfolgt mittels optischer Densitometrie des Eluats. Bei optimaler Anpassung der Temperatur und des Lösungsmittelgradienten an die Erfordernisse des zu untersuchenden DNA-Abschnitts können mittels DHPLC unbekannte Mutationen mit einer Sensitivität von über 96 % erkannt werden (Xiao, W. und Oefner, 2001).

Mit diesen Methoden können bei einem großen Teil der Retinoblastompatienten die krankheitsursächlichen RB1-Gen Mutationen in DNA aus Blut identifiziert werden. Bei der Untersuchung von DNA aus Tumormaterial muss zusätzlich zu den oben beschriebenen Methoden zur Bestimmung von Punktmutationen auch eine Allelotypisierung intragener polymorpher STR-Marker (Small Tandem Repeat-Marker, z.B. RBi2 und RB1.20) zur Erkennung eines Allelverlusts (LOH) durchgeführt werden. Des Weiteren muss in DNA aus Tumormaterial auch der Methylierungsstatus der RB1-Promoter-Region überprüft werden.

1.2 Zielsetzung

Durch die Anwendung der unter 1.1.9 beschriebenen Mutationssuchverfahren konnte die Identifikation krankheitsursächlicher Punktmutationen im RB1-Gen wesentlich vereinfacht werden. Für die Bestimmung großer Deletionen (*gross deletions*) hingegen stand bis vor kurzem kein effizientes Suchverfahren zu Verfügung. Daher konnte einem Teil der Patienten und ihren Familien keine molekulargenetische Risikobestimmung angeboten werden. Die Identifikation dieser Mutationen ist auch erforderlich, um die Mechanismen der Mutationsentstehung besser zu verstehen und die Genotyp-Phänotyp Beziehungen beim Retinoblastom umfassend bestimmen zu können.

Kurz vor Beginn der hier vorgestellten Arbeit wurde die quantitative Multiplex-PCR als ein Verfahren zur effizienten Identifikation von *gross deletions* beschrieben (Richter et al., 2003). Dies war der Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit. Ziel war es, die Mutationen in einem Patientenkollektiv zu bestimmen, das zuvor mit negativem Resultat auf Punktmutationen

untersucht worden war. Als Screeningverfahren für exonische Deletionen sollte das von Richter et al., 2003 veröffentlichte Verfahren der quantitativen Multiplex-PCR weiterentwickelt und mit neu zu entwickelnden spezifischen Bestätigungsverfahren kombiniert werden. So sollten folgende Ziele erreicht werden:

- Vervollständigung und Überprüfung des Mutationsspektrums des RB1-Gens und Identifikation nicht gefundener Mutationen.
- Identifikation von Bruchpunkthäufungen und Analyse möglicher Mutationsmechanismen.
- Analyse der Beziehungen zwischen Genotyp und Phänotyp bei Trägern konstitutioneller *gross deletions*.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, wenn nicht gesondert aufgeführt, von den Firmen Boehringer (Mannheim), Merck (Darmstadt), Sigma (Heidelberg), Serva (Heidelberg) und Invitrogen (Karlsruhe) in *pro analysis* Qualität bezogen.

2.1.2 Enzyme und Reaktionskits

Standardlösungen:

- 10x Ladepuffer: 0,25% Bromphenolblau oder Xylenblau, 15% Ficoll, 10 mM EDTA
- SSC: 150 mM NaCl, 15 mM Na₃-Citrat
- SSPE: 180 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA (pH 7,4)
- TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA
- TE: 10 mM TRIS-HCL (pH 7,8), 1 mM EDTA
- Aqua Bidest: H₂O Bidest Merck Lichrosolv[®]

Spezifische Lösungen/Enzyme:

- Uniplex PCR: *AmpliTaq*[®] DNA Polymerase (5 U/μl) (Perkin Elmer, Weiterstadt)
- Multiplex-PCR: Qiagen-Multiplex-PCR-Kit[®] (Catalog no. 206143)
- Longrange-PCR: Expand High Fidelity PCR System (Roche)
- Expand Long Template PCR System (Roche)
- Gelextraktion: Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen)
- Sequenzierung: Big-Dye Terminator Kit (Applied Biosystems)

2.1.3 Geräte

PCR Geräte:

- GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- GeneAmp[®] PCR System 2700 (Applied Biosystems)
- Peltier Thermal Cycler 200 (MJ Research)

Automatische Elektrophoresegeräte für die Sequenzierung und Mikrosatellitenanalyse:

- ABI PRISM® 377 DNA Sequencer, ABI PRISM® 310 und 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

Echtzeit quantitative PCR (*Real-Time* quantitative PCR, TaqMan®):

- ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems)

2.1.4 Amplifikations- und Sequenzier-Primer

Die für die Analysen erforderlichen PCR-Primer wurden mit Hilfe des Programms „Primer3“ des „Whitehead Institute for Biomedical Research“, Cambridge, MA, USA ausgewählt (www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi). Als Referenzsequenz für Primer im Retinoblastomgen wurde der Datenbankeintrag mit der Zugangsnummer (Accession Number) L11910 verwendet.

Die Bestellung nicht-farbmarkierter Primer erfolgte bei der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien). Die fluoreszenzfarbmarkierten Primer wurden bei der Firma Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) bestellt. Oligonucleotide für Realtime-PCR Analysen wurden mittels ABI-Software ausgewählt und ebenfalls über Applied Biosystems bezogen.

Tabelle 1 Primer für Multiplex-PCR

QMPX-Set	Exon	Name	Positionsname	Sequenz	Label	Fragment (bp)
Q1	5	M5X5	RBg44609se	CTA CTA TGA CTT CTA AAT TAC G		170
		M3X5C	RBg44778as	TCA AGA TGT TTG AGA TTA TTC C	6-FAM	
	26	M5X26C	RBg174280se	CGA AAG CAT CAT AGT TAC TGG	6-FAM	203
		M3X26	RBg174482as	ATA TAA CGA AAA GAC TTC TTG C		
	14	M5X14C	RBg76380se	GTG ATT TTC TAA AAT AGC AGG C	6-FAM	227
		M3X14	RBg76606as	CCA GGA TGA TCT TGA TGC C		
	11	5X11SMULTI	RBg65271se	TGA GAC AAC AGA AGC ATT AT	6-FAM	244
		M3X11	RBg65514as	TGA ACA AAT CTG AAA CAC TAT		
	10	5X10S	RBg64272se	GTG CTG AGA GAT GTA ATG A	6-FAM	264
		M3X10	RBg64535as	TAT CTA AAG GTC ACT AAG C		
	6	M5X6	RBg45706se	CAC AAA AAG AAA CAC CCA AAA G		277
		3X6S	RBg45982as	CAG AGA ATG AGG GAG GAG TA	6-FAM	
	Cy	282-5'		GCC CCT CAC CCG CAC CTA AGT	6-FAM	282
		CY282-3'		GCC GTC CCT CCA AGC ACT G		
	25	5X25S	RBg173647se	TTG CTA ACT ATG AAA CAC T	6-FAM	297
		M3X25	RBg173943as	AAA GAA ATT GGT ATA AGC CAG G		
	K10B	SHGC-78184sense		AGC TGC CAC ATA AGC CAG ATA AG	6-FAM	303
		SHGC-78184reverse		CTG GGC TGA TAA TCC AAC CA TAG		
	15/16	RB15li	RBg76819se	ATT CAA TGC TGA CAC AAA TAA GGT TTC		328

		3X16S	RBg77145as	CCA AAG AAA CAC ACC ACA TT	6-FAM	
	18	M5X18C	RBg149882se	CTG TCA ATT GTG CCT AAA AT	6-FAM	342
		M3X18	RBg150223as	TAT TCA AAA TTC TAT TCC CTA C		
	17	M5X17C	RBg78000se	TTT GTC TGA TAA TAA CTT CC	6-FAM	356
		M3X17	RBg78355as	AGA AAC ACC TCT CAC TAA CA		
	7	5X7S	RBg56786se	TGC GAT TTT CTC TCA TAC AA	6-FAM	405
		M3X7	RBg57190as	CCT CCA TTT GTT GTA TTT TGA C		
	22	M5X22C	RBg161863se	TAT GTG CTT CTT ACC AGT CAA A	6-FAM	496
		M3X22	RBg162358as	GGA GTC ATT TTT GTT GGT GTT G		
Q2	24	5X24MULTI	RBg170299se	GTA TTT ATG CTC ATC TCT GC	6-FAM	206
		M3X24	RBg170504as	GTG TTT GAA TAA CTG CAT TTG G		
	9	M5X9C	RBg61636se	TGA CAC CTC TAA CTT ACC C	6-FAM	232
		M3X9	RBg61867as	ATT ATC CTC CCT CCA CAG TCT C		
	3	M5X3C	RBg39386se	CATAGTATCCAGTGTGTGAA	6-FAM	250
		M3X3	RBg39635as	AAGTCTATTGAGAGGAAAATCC		
	12	M5X12C	RBg70197se	CTC CCT TCA TTG CTT AAC ACA T	6-FAM	270
		M3X12	RBg70466as	AAA AGC AAG AAA AGA TTA TGG		
	Cy	282-5'		GCC CCT CAC CCG CAC CTA AGT	6-FAM	282
		CY282-3'		GCC GTC CCT CCA AGC ACT G		
	K10B	SHGC-78184sense		AGC TGC CAC ATA AGC CAG ATA AG	6-FAM	303
		SHGC-78184reverse		CTG GGC TGA TAA TCC AAC CA TAG		
	20	M5X20	RBg156554se	GAA AAG AGT GGT AGA AAA GAG G		324
		M3X20C	RBg156877as	AGT AGG GAG GAG AGA AGG TG	6-FAM	
	13	M5X13	RBg73600se	TGC TTA TGT TCA GTA GTT GTG		339
		3X13S2	RBg73938as	GAA CTG GAA AGA TGC TGC	6-FAM	
	23	M5X23C	RBg162110se	GGT AGG TCA AAA GTA TCC TT	6-FAM	351
		M3X23	RBg162460as	ATT TGA AAT GAA GAA TGC TT		
	19	M5X19C	RBg153137se	CTT GAA GTG TAT GTA TAA TC	6-FAM	374
		M3X19	RBg153510as	GCA ACA TTA TCA TTT CCA TTT T		
Q3	4	M5X4C	RBg41808se	AGT AGT GAT TTG ATG TAG AGC T	6-FAM	267
		RB4re	RBg42075as	AGT GTA ACC CTA ATA AAA TG		
	21	M5X21C	RBg160614se	ATA ACT CTG TAG ATT AAA CC	6-FAM	283
		M3X21	RBg160896as	TTA CCT ATG TTA TGT TAT GG		
	K10B	SHGC-78184sense		AGC TGC CAC ATA AGC CAG ATA AG	6-FAM	303
		SHGC-78184reverse		CTG GGC TGA TAA TCC AAC CA TAG		
	Cy	282-5'		GCC CCT CAC CCG CAC CTA AGT	6-FAM	329
		CY329-3'		CCA GGA TGA GAG CGG ATG GCA		
	8	M5X8C	RBg59542se	GTA GTA GAA TGT TAC CAA GA	6-FAM	342
		M3X8	RBg59883as	TGC TCA TAA CAA AAG AAG TAA		
Q3	27	M5X27C	RBg176955se	ACT TAC CCA GTA CCA TCA ATG C	6-FAM	380
		M3X27	RBg177334as	GAG GAA ACA ATC TGC TAC AAC		
Q3	2	DR5X2	RBg5353se	GAA ACA AGT ATG TAC TGA ATC	6-FAM	392
		M3X2	RBg5744as	TTA CAG GCA TGA ACC ACC GT		

Tabelle 2 Primer für Longrange-PCR

Name	Positionsname	Sequenz
RB21ili	RBg160684se	CCA TGT AAT AAA ATT CTG ACT AC
RBi23as2	RBg162632as	AAT GCA GAAATC ACC CGT CT
RBi13se3	RBg73507se	CTC TAG CCT AGT GGC AGA AA
RBi16as	RBg77198as	GAT CTA AAA TAA GCA TTC CTT CTC C
RBi17as2	RBg78386as	TTC CCT ATT TGT TCT TGA GGT
RB3ili	RBg39383se	TTA CAT AGT ATC CAG TGT GTG
RB5re	RBg44786as	CCT AAC TAT CAA GAT GTT TG
RBi09se	RBg61654se	CTG CAT TGT TCA AGA GTC AAG AG
RB11as3	RBg65518as	AAC GTG AAC AAA TCT GAA ACA
Exon23	RBg162386se	GGG AAG TAG TAA AGA ATG AGA GGG GGA TTA
Exon26	RBg174526as	ATG CAT AAA CAA ACC TGC CAA CTG AAG AAA
Intron23innen	RBg166248se	GCT GGT TCA ATA TAC CA AAT CAA TA ATG
Intron24aussen	RBg173837as	TCA TCT GAT CCT TCA ATA TCA AAG CGT AGT
Intron24innen	RBg171908as	AAA AAT ATA AGC TCT CAG GGG AAT GGA GAT
WildtypEx24	RBg170286se	AGT TCA GAA TGA TGT ATT TAT GCT CAT CTC TGC

Tabelle 3 Primer für Realtime-PCR

Primer Name	Positionsname	Typ	Sequenz
Rb1up-RT-MGB	RBg-534-MGB/VIC	Taqman Sonde	CCTGCGTTAGTTTGCT
RB1up-RT-Se	RBG-563se	Sense Primer	TGAGAACATGCAGTGTTTGTTT
RB1up-RT-As	RBg-496as	Antisense Primer	TGGAGCCAGAAGCCTTTA TCC
RB2-RT-FAM	RBg-5458-FAM	Taqman Sonde	ACTGCATTATGTCAGAAATTAAGATACCAGATCATGTCA
RB2-RT-Se	RBg5412se	Sense Primer	TTCATTTGGTAGGCTTGAGTTTGA
RB2-RT-As	RBg5522as	Antisense Primer	TCCCAAGTTAACCAAGCTCTCTCT
RB4-RT-MGB	RBg.41981MGB/FAM	Taqman Sonde	AATGCTATGTCAAGACTG
RB4-RT-Se	RBg.41951se	Sense Primer	AAAGAAATTGATACCAGTACCAAAGTTG
RB4-RT-As	RBg.42027as	Antisense Primer	AGTGCAAACAATACATCATACTTCTTCA
RB7-RT-FAM	RBg56971FAM	Taqman Sonde	TTTAATTTATGCCCTTTTACTTTCTCATTGAGCAGT
RB7-RT-Se	RBg56941se	Sense Primer	CATGTTGCTCAAAGAACCATA TAGGAAGT
RB7-RT-As	RBg57034as	Antisense Primer	TGGTACCCACTAGACATTCAATAAGC
RB10-RT-MGB	RBg64283MGB/FAM	Taqman Sonde	TGTAATGACATGTAAAGGAT
RB10-RT-Se	RBg64260se	Sense Primer	CTGTGCCTCTGTGTGCTGAGA
RB10-RT-As	RBg64332as	Antisense Primer	AACCTTGAAAGAAAAAGTCACTGACA
RB17-RT-MGB	RBg78156MGB/FAM	Taqman Sonde	AGCCTTTGATTTTACAAAGTGATCG
RB17-RT-Se	RBg77951se	Sense Primer	CCATGATTCTGAATGTGCTTAAT
RB17-RT-As	RBg78207as	Antisense Primer	GTTGCCTTCTGCTTTGATAAACTT
RB18-RT-MGB	RBg150047MGB/FAM	Taqman Sonde	CAACTGATCACCTTGAATC
RB18-RT-Se	RBg150024se	Sense Primer	ACAATCAAAGGACCGAGAAGGA
RB18-RT-As	RBg150092as	Antisense Primer	TGGAGAGGAAGATTAAAGAGGACAAG
RB24-RT-MGB	RB170273MGB/FAM	Taqman Sonde	TGGTATTCCTAATAGTTCAGAATG
RB24-RT-Se	RBg170244se	Sense Primer	TGGTTCTAGGGTAGAGGTAACCTTTAA
RB24-RT-As	RBg170325as	Antisense Primer	CAATTTTGCAGAGATGAGCATAAATAC

2.1.5 Patienten und Proben

Es wurde DNA aus Tumor- und Blutproben von Patienten mit Retinoblastom untersucht. Die meisten dieser Patienten wurden in der Augenklinik des Universitätsklinikums Essen behandelt.

Bei allen untersuchten Patienten wurde die Diagnose eines Retinoblastoms von der einsendenden Augenklinik klinisch und, bei operativer Entfernung des Tumors, auch histopathologisch gesichert.

Mit dem Einverständnis der Patienten und gegebenenfalls der Angehörigen („informed consent“) wurde Blut und Tumormaterial zur molekulargenetischen Diagnostik eingesandt, um eine Ausschlussdiagnostik bei Angehörigen oder Nachkommen der Betroffenen zu ermöglichen.

Viele der hier zur Analyse vorgesehenen Proben waren zuvor bereits mittels DHPLC, SSCP oder Heteroduplexanalyse auf Punktmutationen hin untersucht worden (Lohmann et al., 1997; Klutz et al., 1999).

Bei DNA Proben aus Tumormaterial war durch vorangegangene Allelotypisierung zweier intragener polymorpher STR-Marker (Small Tandem Repeat-Marker RBi und RB1.20) ein möglicher „*loss of heterozygosity*“ (LOH), festgestellt worden (Lohmann, 1999).

2.2 METHODEN

2.2.1 Präparation von DNA aus Tumorgewebe

In einen konischen Glashomogenisator (Kapazität 1 ml) wurden 250 µl 750 mM NaCl/24 mM EDTA/10 mM TrisHCl (pH 8) pipettiert und ein kleines Tumorstück (etwa 5-20 mg) zugegeben. Nach der gründlichen Homogenisierung wurde die Flüssigkeit in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und nochmals 250 µl NaCl/EDTA/TrisHCl zugegeben. Anschließend wurde 25 µl 10% SDS und 10 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugefügt und für 4 h bei 37°C in einem Wasserbad oder Thermomixer (850 U/min) inkubiert. Danach wurden 300 µl Phenol zugegeben, gut geschüttelt und für 5 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 300 µl Chloroform/Isoamylalkohol (96% / 4%) geschüttelt. Anschließend wurde für 5 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Die letzten beiden Schritte wurden 2-3 mal wiederholt. Nachdem die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde, erfolgte die Fällung der DNA durch die Zugabe von 50 µl Natriumacetat und 900 µl 100% Ethanol. Die DNA wurde mit

einer Pasteurpipette aus dem Ansatz geangelt, in einem neuen Reaktionsgefäß mit 70% Ethanol gewaschen, 15 min an der Luft getrocknet und in 100 µl TE gelöst.

2.2.2 Präparation von DNA aus Blut

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben von DNA aus Blut waren bei den meisten Patienten bereits für die Voruntersuchungen (2.1.6) mit verschiedenen Methoden aus Blutlymphozyten extrahiert worden:

- Für die vor 1999 präparierten Blutproben war das Nucleon BACC2-Kit der Firma Amersham LIFE SCIENCE gemäß den Angaben des Herstellers verwendet worden.
- Seit 1999 wurde vermehrt die DNA Präparation nach einem Protokoll der Firma Qiagen durchgeführt. Dieses Protokoll wurde für die meisten im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu untersuchten Blutproben verwendet.

Qiagen-Protokoll zur DNA-Extraktion aus Blutlymphozyten:

Die Blutprobe (venöses Blut) wurde bis zur Verwendung bei -20°C in den zur Entnahme verwendeten EDTA-Röhrchen gelagert. Zur Präparation wurden 1ml EDTA-Blut mit 2,5 ml Lyse-Puffer (FG1) gemischt und nach zehnminütigem Rühren für 5 min bei 2000g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das zurückbleibende Pellet mit 0,5 ml eines Gemisches aus Denaturations-Puffer (FG2) und Qiagen-Protease (Mischverhältnis 1:100) aufgenommen und direkt darauf gevortext. Besonders bei älteren Blutproben ließ sich das Pellet oft schlecht homogenisieren. In diesem Fall wurden 100 µl Denaturations-Puffer (FG2) hinzugegeben und erneut gründlich gevortext. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 65°C im Schüttelblock schlug die Farbe des Gemisches um von rötlich zu oliv, was die komplette Protein-Verdauung anzeigte. Die DNA ließ sich nun mittels 0,5 ml Isopropanol (100%) ausfällen. Nach 3-minütigem Zentrifugieren bei 2000 g wurde der Überstand verworfen. Nach kurzem Trocknen wurde die ausgefällte DNA mit 0,5 ml 70%igem Ethanol gewaschen und dann wieder für 3 min bei 2000 g herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgekippt, das Pellet für ca. 1 Std getrocknet und danach in 200 µl Hydrations-Puffer aufgenommen. Um die DNA vollständig zu lösen, wurde das Gemisch 1 Std. bei 65°C inkubiert und danach über Nacht bei Raumtemperatur auf den Rührer gelegt.

- Seit Mitte 2003 wird DNA aus Blutlymphozyten vollautomatisch durch einen Bio – Robot EZ1 der Firma Qiagen gewonnen. Die für diese Arbeit neu angeforderten Blutproben wurden auf diese Weise präpariert.

2.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Ein Aliquot der zu messenden DNA-Probe wurde in Wasser verdünnt und die Absorption bei 260 und 280 nm in einem Spektralphotometer (Ultrospec III Pharmacia) ermittelt. Die optische Dichte (OD) von 1 bei 260 nm entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml einzelsträngiger DNA. Die OD₂₆₀ Werte wurden also mit dem Faktor 50 (DNA) und dem Verdünnungsfaktor, multipliziert um die DNA Konzentration in µg/ml zu erhalten. Zur Abschätzung der Proteinverunreinigung der DNA wurde der Quotient aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀ gebildet. Bei proteinfreier DNA betrug dieser etwa 1,8.

2.2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Zur Validierung der Synthese wurden alle neu synthetisierten Primer zunächst in einer Simplex-Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) auf Spezifität und Kontamination getestet.

Reaktionsmix zum Testen der Primerpaare im Uniplex-Ansatz:

Individuelles Reaktionsvolumen (IRV): 25µl

2,5 µl 10x PCR Buffer I
 4,22 µl dNTP's (1,25 mM)
 1,25 µl forward Primer (50ng/µl)
 1,25 µl reverse Primer (50ng/µl)
 11,54 µl H₂O Bidest Merck LiChrosolv®
0,24 µl Taq-Polymerase
 4 µl DNA (60 ng/µl)

Das PCR-Protokoll variierte für die verschiedenen Multiplex Sets:

	Q1	Q2	Q3	Q4
Initiale Denaturierung:	94°C 2 min	94°C 2 min	94°C 2 min	94°C 2 min
Denaturierung:	94°C 30s	94°C 30s	94°C 30s	94°C 1 min
Annealing:	55°C 50s	55°C 35s	54°C 35s	61°C 1min30s
Elongation:	68°C 2 min	68°C 2min30s	70°C 2min30s	72°C 4 min
Finale Elongation:	68°C 4 min	68°C 4 min	70°C 4 min	72°C 4 min
Kühlen:	4°C hold	4°C hold	4°C hold	4°C hold

2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der PCR-Effizienz, DNA-Mengenabschätzung sowie zur Beurteilung der PCR-Produkte von Longrange-PCRs wurden 0,8 – 2,5% ige Agarose-Gele hergestellt. Die Agarose wurde in 1x TAE Puffer aufgekocht, mit 0.4 µg/ml Ethidiumbromid versetzt, auf etwa 65°C abgekühlt und in horizontale Gelträgerformen gegossen. Von 25 µl PCR Ansätzen wurden jeweils 5 µl aufgetragen. Dazu wurden die Proben vor dem Auftrag mit 6x Ladepuffer gemischt (Endkonzentration 1x) und bei ca. 3 V/cm in 1x TAE Puffer mit 0.4 µg/ml Ethidiumbromid aufgetrennt. Als DNA-Größenstandard dienten die 1 kb Leiter (Invitrogen), *MspI*-gespaltene pUC19 DNA (MBI Fermentas, St.Leon-Roth) und *HindIII*-geschnittene Lambda-DNA (Boehringer). Die Gele wurden auf einem Transilluminator unter UV-Licht (302 nm) begutachtet und mit einem digitalen Fotodokumentationssystem (Herolab, Wiesloch) fotografiert und auf Thermopapier ausgedruckt.

2.2.6 Quantitative Multiplex-PCR (QMPX-PCR)

Das hier verwendete Protokoll der quantitativen Multiplex-PCR (QMPX-PCR) zum Deletionsscreening im RB1-Gen ist eine Weiterentwicklung des von der Gruppe um Brenda Gallie in Toronto entwickelten Protokolls (Richter et al., 2003). Es umfasst vier Multiplex-PCR Ansätze, in denen mit jeweils unterschiedlichen PCR-Programmen zwischen drei und dreizehn Zielsequenzen mit fluoreszenzmarkierten (6-FAM) Primern amplifiziert werden. Jedes Primerpaar überspannt eines der Exons 1 bis 27 des RB1-Gens sowie die flankierenden intronischen Splice-Signale. Lediglich die Exons 15 und 16 werden von nur einem Primerpaar überspannt, da das dazwischenliegende Intron kurz ist. Zusätzlich enthält jeder Ansatz als interne Kontrolle ein Primerpaar zur Amplifikation des Exons 4 des Retinaldehydgens (auf Chromosom 15).

Die amplifizierten Fragmente für verschiedene Regionen in einem Reaktionsset können durch Bestimmung der Länge unterschieden werden. Um im linearen Bereich der Amplifikation zu bleiben wird die PCR nur mit 19 Zyklen durchgeführt.

Sowohl die Zusammensetzungen der Primer der einzelnen Multiplex-PCR-Ansätze, als auch die PCR-Cycling-Temperaturen sowie das Protokoll der Reaktionsansätze wurden gegenüber dem Protokoll aus Toronto modifiziert. Dies war erforderlich, um konstantere Ergebnisse zu erreichen:

- Es wurden einzelne Primer ausgetauscht um bessere Amplifikation des spezifischen Segments zu erreichen (Forward-Primer für die Region um Exon 16 Rbg76819se: ATT CAA TGC TGA CAC AAA TAA GGT TTC, mit einem PCR-Produkt von 325

bp) oder um Längenüberschneidungen mit anderen Primern des gleichen Multiplex-Ansatz zu vermeiden (Reverse-Primer für die Region um Exon 4 RBg42075as: AGT GTA ACC CTA ATA AAA TG, mit einem PCR-Produkt von 267 bp).

- Mit einem speziell für Multiplex-PCRs entwickelten Kit der Firma Qiagen ließ sich eine konstantere Amplifikation erreichen. Daher wurden das Reaktionsprotokoll und die PCR-Cycling-Temperaturen diesem Protokoll angepasst. Weiterhin erwies sich ein einzelner interner Standard im Rahmen der molekulargenetischen Diagnostik von Patienten in dieser Arbeit als nicht ausreichend. Deshalb wurde zu jedem Multiplex Set ein Primerpaar zur Amplifikation eines 301 bp langen Fragments von Chromosom 10 als zusätzlicher interner Standard hinzugefügt (SHGC-78184, Chromosom 10 Position 74955571 und 74955873 bp, Primers SHGC-78184sense: AGC TGC CAC ATA AGC CAG ATA AG und SHGC-78184antisense: CTG GGC TGA TAA TCCAAAC CAT AG).

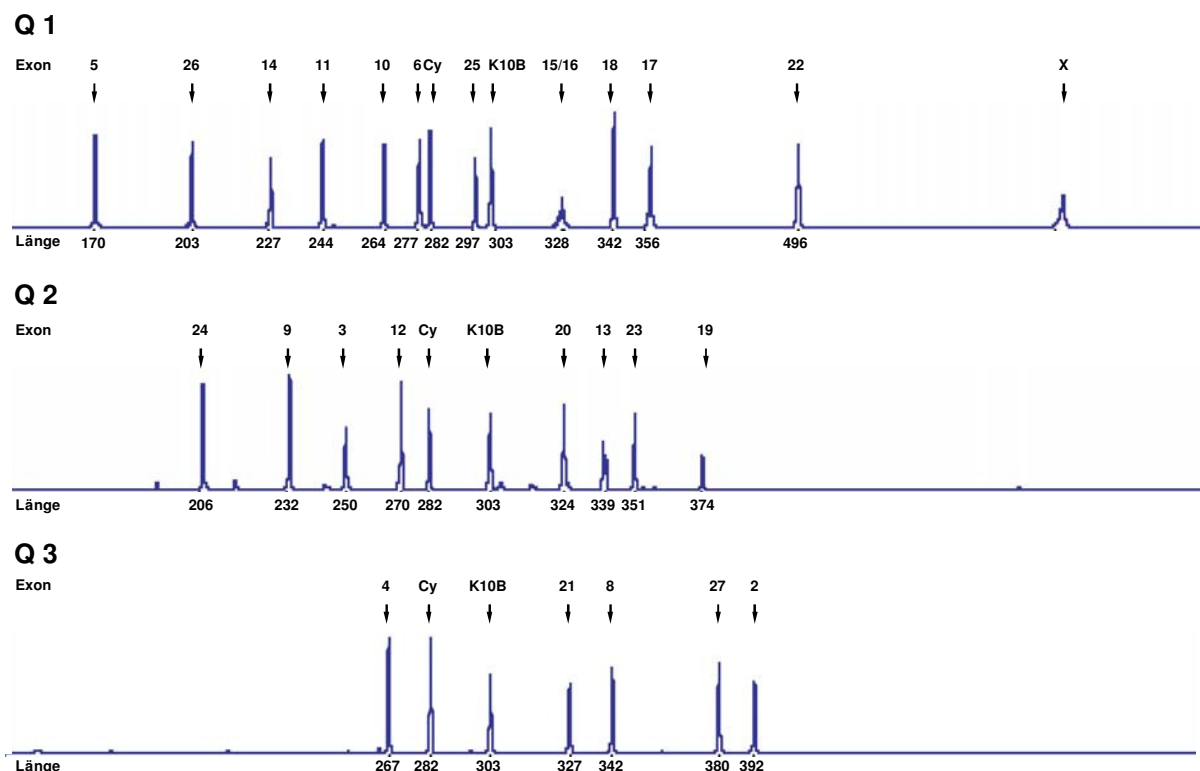


Abb. 4: Ergebnisse einer Multiplex-PCR Serie (Sets Q1, Q2 und Q3) an DNA von einer Normalperson. Längenangaben der PCR-Produkte in Basenpaaren (bp).

Modifiziertes Protokoll zur QMPX-PCR (*Modifikationen kursiv*):

Template (zu analysierende Probe): 240 ng genomische DNA (entsprechend 4 µl mit einer Konzentration von 60 ng/µl)

Benötigte Materialien:

Qmpx-Primer-Mastermix für die Primersets Q1 bis Q3

Qiagen-Multiplex-PCR-Kit® (Catalog no. 206143)

H₂O Bidest Merck LiChrosolv®

Protokoll:

1. ReaktionsMix:

Identisch für Q1, Q2 und Q3

Individuelles Reaktionsvolumen (IRV): 25µl

12,5µl Qiagen Multiplex PCR Kit®

4,3µl Primerset Mastermix (Q1, Q2 oder Q3)

4,2µl H₂O Bidest Merck LiChrosolv®

4µl DNA (60 ng/µl)

2. PCR-Cycling-Programm:

	Q1	Q2	Q3	
Initiale Denaturierung:	95°C 15 min	95°C 15 min	95°C 15 min	
Denaturierung:	94°C 30s	94°C 30s	95°C 30s	
Annealing:	55°C 1min30s	55°C 1min30s	54°C 1min30s	x19
Elongation:	68°C 2 min	68°C 2min30s	70°C 2min30s	
Finale Elongation :	72°C 10 min	72°C 10 min	72°C 10 min	
Kühlen:	4°C hold	4°C hold	4°C hold	

3. Primer:

Die Primerkonzentrationen innerhalb der 4 Primersets wurden für jeden Primer optimiert.

Q1		
Exon	Primer	Konzentration (ng/µl)
15/16	<i>Rb15li</i> , M3x15.16s	51,38 (<i>Rb15li</i>), 37,5 (<i>M3x15</i>)
17	M5x17c, 3x17	12,5
18	M5x18c, 3x18	12,5
11	M5x11s, 3x11	18
14	M5x14c, 3x14	12,5
25	M5x25s, 3x25	11
22	M5x22c, 3x22	18,75
5	M3x5c, 5x5	23
7	M5x7s, 3x7	9
6	M3x6s, 5x6	12,5
10	M5x10s, 3x10	9
Standard CY	Cy282-5c, Cy282-3	3,8
Standard K10B	K10B For, K10B Rev	12,5

Q2		
Exon	Primer	Konzentration (ng/μl)
24	M5x24multi, M3x24	12,5
9	M5x9c, M3x9	12,5
3	M5x3c, ERB3x3	25
20	M3x20c, 5x20	25
13	5x13multi, 3x13s2	12,5
23	M5x23c, 3x23	40
19	M5x19c, M3x19	38
12	M5x12c, M3x19	12,5
Standard CY	Cy282-5c, Cy282-3	3,8
<i>Standard K10B</i>	<i>K10B For, K10B Rev</i>	12,5

Q3		
Exon	Primer	Konzentration (ng/μl)
4	M5x4c, <i>Rb4ire</i>	12
8	M5x8c, M3x8	25
21	M5x21c, M3x21-2	25
27	M5x27c, M3x27	20
2	M5x2c, M3x2	38
Standard CY	Cy282-5c, Cy282-3	3,8
<i>Standard K10B</i>	<i>K10B For, K10B Rev</i>	12,5

Die als zusätzliche interne Kontrolle eingeführten Primer (K10B) amplifizieren ein Fragment auf Chromosom 10, Position 74955571-74955873 der NCBI Sequence Map und sind unter der Bezeichnung SHGC-78184 der Datenbank erfaßt.

2.2.7 Automatisierte Kapillarelektrophorese

Das verwendete automatische Elektrophoresegerät (ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer) arbeitet mit 16 Glaskapillaren, die automatisch mit einem Polymer (POP-6[®], Applied Biosystems) befüllt werden. Nach elektrophoretischer Auftrennung werden die PCR-Produkte von einem Laserstrahl erfaßt, der die an die Primer gebundenen Fluorochrome (6-FAM) anregt, farbstoffspezifisch Licht verschiedener Wellenlänge zu emittieren. Die Emission wird von einem Spektraldetektor erfaßt und die so erhaltenen Signale von einem Computer ausgewertet.

Zur exakten Längenbestimmung der DNA Fragmente wurde jeder Probe ein DNA-Längenstandard beigemischt (GeneScan-500, Applied Biosystems, mit 6-Carboxy-X-Rhodamin (6-ROX[®]) fluoreszenzmarkiert). Die Probenvorbereitung und Bedienung des Gerätes erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers. Für jede Analyseposition wurden 1 μl des Multiplex-PCR Produkts mit 1 μl ROX-Size-Standard (ABI) und 11 μl Hi-Dye[®] Formamidlösung (ABI) eingesetzt. Die Bestimmung der Fragmentgrößen und deren

Quantifizierung erfolgte mit den Computerprogrammen GeneScan[®] und Genotyper[®] (Applied Biosystems).

2.2.8 Bestätigungsmethoden

Zur Überprüfung der Ergebnisse der quantitativen Multiplex-PCR wurden Assays auf Grundlage von Realtime- (2.2.9.1) und Longrange-PCR (2.2.9.2) etabliert. Kleine Längenmutationen wurden mittels direkter Sequenzierung bestätigt. Des Weiteren wurde die Sequenzierung zur genauen Charakterisierung der Bruchstellen von Einzelexon-Deletionen eingesetzt.

2.2.8.1 Genomische Realtime-PCR

Als Methode zur Bestätigung von Deletionen wurden Assays auf Grundlage der genomischen Realtime-PCR Assays nach dem Taqman Prinzip (ABI) etabliert. Im Einzelnen wurden in der vorliegenden Arbeit Reaktionen für die Exons 2, 4, 7, 10, 17, 18, 24 sowie für den Bereich unmittelbar upstream des Promoters neu entwickelt. Primer und Sonden wurden mittels „Primer-Express“ Software (ABI) ausgewählt. Für die Sonden wurde als Reporter FAM oder VIC, als Quencher TAMRA oder DARK (Minor Groove Binder Sonde) verwendet. Die Realtime-PCR wurde im ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) durchgeführt.

Prinzip der genomischen Realtime-PCR

Die quantitative Realtime-PCR ermöglicht die Quantifizierung spezifischer RNA und DNA Sequenzen. Grundlage ist die Detektion eines Fluoreszenzsignals, dessen Intensität proportional zu der Menge des in der PCR synthetisierten Produktes ist (Heid et al., 1996; Gibson et al., 1996). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit dem sog. TaqMan[®] System gearbeitet:

Jeder Realtime-PCR Assay umfasst 2 Primer und eine zwischen den Primern bindende TaqMan[®] Sonde. Die Annealing-Temperatur der Sonde sollte 10°C höher sein als die der Primer. Die Sonde ist am 5'-Ende mit einem Reporter-Fluorochrom (6-FAM oder VIC) und am 3'-Ende mit einem Quencher-Fluorochrom (TAMRA oder DARK) versehen (Livak et al., 1995). Befinden sich beide Fluorochrome an dem Oligonukleotid, unterdrückt das Quencher-Molekül die Fluoreszenz des Reporter-Moleküls. Bei der Amplifikation in der PCR-Reaktion degradiert die *Taq* Polymerase durch ihre intrinsische 5'-3' Nuclease-Aktivität die zwischen den Primern bindende TaqMan Sonde. Dadurch werden das Reporter-Fluorochrom und der

Quencher räumlich voneinander getrennt, was zur Emission eines Fluoreszenzsignals nach Laser-Anregung führt (s. Abb. 5).

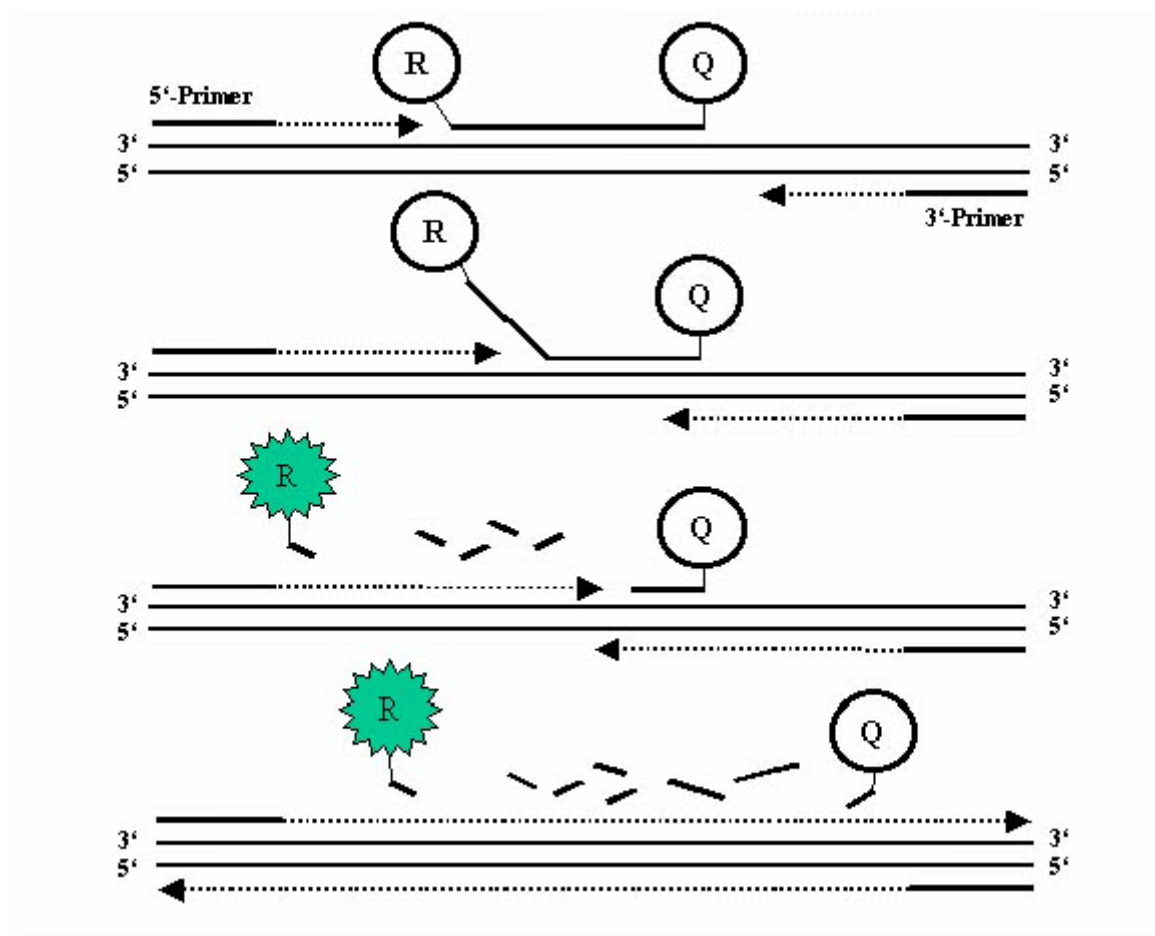


Abb. 5: Funktionsweise der Realtime-PCR nach dem Taqman-Detektionsprinzip. Durch die 5'-3' Exonucleaseaktivität der Taq-Polymerase wird die Taqmansonde zersetzt, und so der Quencher vom Reporter losgelöst. Dies ermöglicht nach Anregung eine Lichtemission.

Das Fluoreszenzsignal wird alle 7 sec gemessen, die erhaltenen Werte werden weiter verarbeitet und nach Abschluss der Reaktion analysiert.

Das Ergebnis der Analyse ist der Ct Wert (Schwellenzyklus, *cycles at threshold*), welcher der PCR Zykluszahl entspricht, bei der das Fluoreszenzsignal eine in die exponentiellen Phase der Amplifikation gelegte Intensitätsschwelle (*threshold*) erreicht (s. Abb. 6).

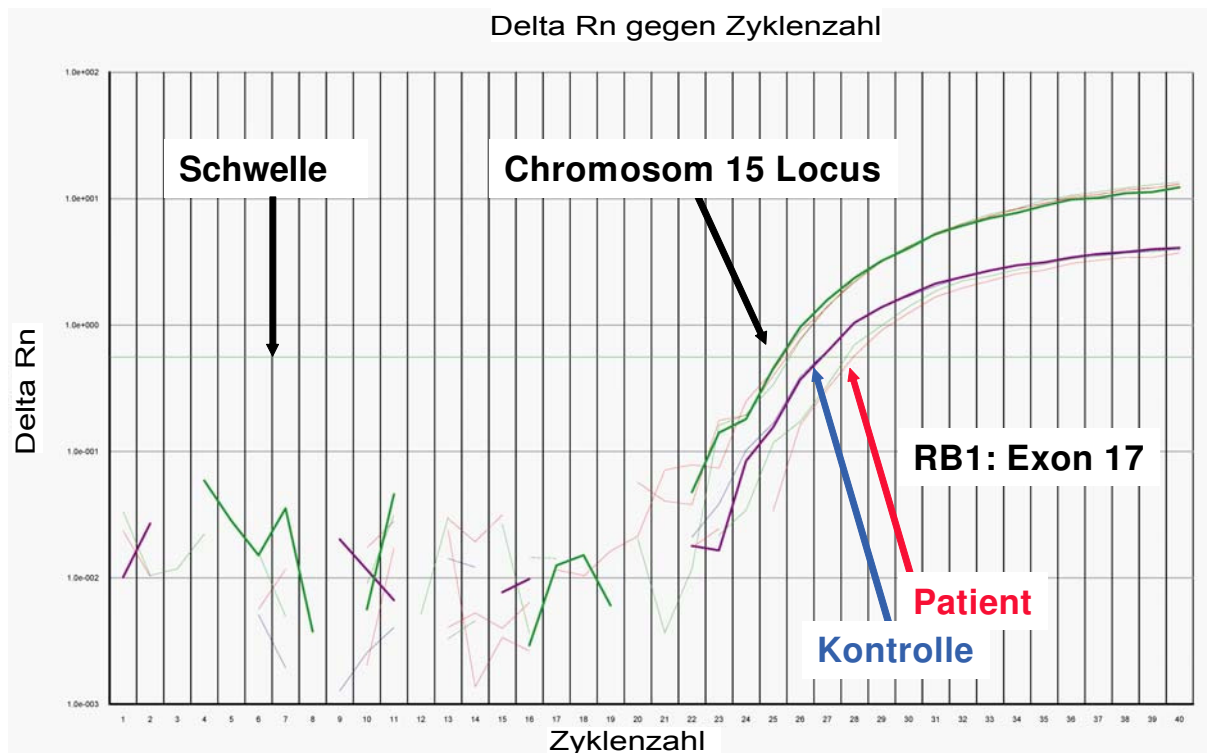


Abb. 6: Quantitative Real-Time PCR. Darstellung der Amplifikation von Exon 17 des RB1 sowie der internen Kontrolle auf Chromosom 15 bei einer Normalkontrolle und einem Patienten mit heterozygoter Deletion. Die Amplifikation der Exon 17 Region erreicht bei heterozygoter Deletion die Ct Schwelle (grün) erst einen Zyklus später. Die Amplifikation der Kontrolle erreicht für beide Proben im gleichen Zyklus die Schwelle ($\Delta Ct = +1$ für den Patienten im Vergleich zur Normalkontrolle).

Der Ct Wert verhält sich umgekehrt proportional zur Anzahl der eingesetzten Zielmoleküle (Menge des Templates): je größer die Anzahl der Zielmoleküle, desto niedriger ist der Ct Wert. So lassen sich die Ausgangsmengen an Template für die Zielsequenzen anhand der Ct Werte vergleichen. Bei Normalpersonen ist die Differenz der Schwellenzyklen (ΔCt) für RB-Sonde und für eine außerhalb des RB1 hybridisierender Kontrollsonde, unabhängig von der eingesetzten Gesamt-DNA-Menge, konstant ($\Delta Ct = Ct_{(RB1)} - Ct_{Kontrolle} = \text{konstant}$). Im Falle einer heterozygoten Deletion, bei der nur die Hälfte der Ausgangsmenge an Template für die spezifische RB-Sequenz vorliegt, ist bei exponentieller Amplifikationskinetik ein Zyklus mehr erforderlich um das gleiche relative Fluoreszenzsignal zu erreichen, das bei DNA aus Normalpersonen erhoben wird. Daher ist das ΔCt zwischen RB-Sonde und Standard um 1 erhöht ($\Delta Ct = +1$).

Um eine absolute Quantifizierung zu erreichen, wurden in dieser Arbeit Messungen an Verdünnungsreihen durchgeführt. Jede der 96-Well Realtime-PCR Optical Plates enthielt Reaktionen mit Verdünnungsreihen genomischer DNA (200, 100, 50, 25 und 12,5 ng DNA

in 25µl individuellem Reaktionsvolumen). Mithilfe dieser Verdünnungsreihen wurden für jeden Taqman-Assay Standardkurven erstellt.

Mittels dieser Standardkurven konnte aus den Ct-Werten (Zykluszahlen bis zum Erreichen des Threshold) die Menge an PCR-Produkt (in ng) bestimmt werden. Die erhaltenen DNA-Mengen für die spezifischen Zielsequenzen wurden mit denen einer simultan amplifizierten internen Kontrollregion verglichen. Als Kontrolle diente eine Sonde für das Imprinting-Zentrum auf Chromosom 15 (ASSRO 1, Buiting et al. unveröffentlicht).

Alle PCR-Reaktionen wurden in separaten Reaktionstubes und im Doppelansatz durchgeführt, um den Einfluss von Pipettierfehlern zu vermindern.

Die Realtime-PCR wurde nach dem Standardprotokoll mit ABI Taqman Universal PCR Mastermix im ABI Prism7000 Sequence Detection System durchgeführt:

Reaktionsansatz für genomische Taqman Realtime-PCR:

Individuelles Reaktionsvolumen: 25 µl
12,5 µl Taqman Universal PCR Mastermix (ABI)
2,5 µl Primer Forward (3 µM) = 300 nM Endkonzentration
2,5 µl Primer Reverse (3 µM) = 300 nM Endkonzentration
2,5 µl Sonde (2,5 µM) = 250 nM Endkonzentration
60 ng DNA

mit H₂O auf 25 µl auffüllen

Cycling Protokoll für Taqman Realtime-PCR:

Hotstart:	50°C – 2 min	
Initiale Denaturierung:	95°C – 10 min	
Denaturierung:	95°C – 15 sec	x 40
Annealing/Elongation:	60°C – 1 min	
Kühlen:	4°C – unendlich	

Verwendete Primer und Sonden siehe oben:

Die Auswertung erfolgte mit ABI Prism 7000 und Microsoft Excel Software.

2.2.8.2 Longrange-PCR

Zur Synthese von PCR-Produkten von einer Länge unter 5 Kilobasenpaaren (kb) wurde das Expand High Fidelity PCR System (Roche), für noch längere Fragmente das Expand Long Template PCR System (Roche) verwendet. Beide PCR Systeme enthalten einen speziellen Polymerase Mix aus Taq-Polymerase und Tgo Proofreading Polymerase mit 3' – 5' Exonuclease-Aktivität.

Reaktionsansatz für Expand High Fidelity System:

Individuelles Reaktionsvolumen: 10 µl
1,6 µl dNTP's (1,25 mM) = 200 µM Endkonzentration
0,2 µl Primer Forward (20 µM) = 0,4 µM Endkonzentration
0,2 µl Primer Reverse (20 µM) = 0,4 µM Endkonzentration
120 ng genomische DNA

in separatem Mastermix, der erst am Ende dazugegeben wird:
1 µl 10x Buffer (im Roche Kit enthalten)
0,15 µl Polymerase Mix (im Roche Kit enthalten)

mit H₂O auf 10 µl auffüllen

Cycling Protokoll für Expand High Fidelity System:

Initiale Denaturierung:	94 ⁰ C – 2 min	
Denaturierung:	94 ⁰ C – 15 sec	
Annealing:	45 ⁰ C – 65 ⁰ C – 1 min	x10
Elongation:	68 ⁰ C – 45 sec – 8 min ^a	
Denaturierung:	94 ⁰ C – 15 sec	
Annealing:	45 ⁰ C – 65 ⁰ C – 1 min	x25
Elongation:	68 ⁰ C – 45 sec – 8 min ^a + 5sec/Zyklus	
Finale Elongation:	72 ⁰ C – 7 min	
Kühlen:	4 ⁰ C – unendlich	

^a Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge der zu amplifizierenden Fragmente

Die Annealing Temperaturen wurden mittels Gradient-PCR ermittelt, und sind, wie auch die Elongationszeiten, für jede Longrange-PCR unterschiedlich:

Annealing Temperaturen: Exon 21-23: 58⁰C
Exon 13-16: 56⁰C
Exon 13-17: 58,5⁰C
Exon 3-5: 59⁰C
Exon 9-11: 59⁰C

Elongationszeiten: Exon 21-23: 2 min (ca. 2 kb)
Exon 13-16: 5 min (ca. 3,7 kb)
Exon 13-17: 5 min (ca. 4,9 kb)
Exon 3-5: 5:30 min (ca. 5,4 kb)
Exon 9-11: 4:00 min (ca. 3,9 kb)

Primer: Exon 21: RBg160684se
Exon 23: RBg162632as
Exon 13: RBg73507se
Exon 16: RBg77198as
Exon 17: RBg78386as
Exon 3: RBg39383se
Exon 5: RBg44786as
Exon 9: RBg61654se
Exon 11: Rbg65518as

Reaktionsansatz für Expand Long Template PCR System:

Individuelles Reaktionsvolumen: 10 µl
1 µl 10x Buffer (im Roche Kit enthalten)
4 µl dNTP's (1,25 mM) = 500 µM Endkonzentration
0,2 µl Primer Forward (20 µM) = 0,4 µM Endkonzentration
0,2 µl Primer Reverse (20 µM) = 0,4 µM Endkonzentration
0,15 µl Polymerase Mix (im Roche Kit enthalten)
120 ng genomische DNA

mit H₂O auf 10 µl auffüllen

Cycling Protokoll für Expand Long Range System:

Initiale Denaturierung:	94°C – 2 min	
Denaturierung:	94°C – 10 sec	
Annealing:	45°C – 65 °C – 30 sec	x10
Elongation:	68°C – 45 sec – 30 min ^a	
Denaturierung:	94°C – 15 sec	
Annealing:	45°C – 65 °C – 30 sec	x25
Elongation:	68°C – 45 sec – 30 min ^a + 20 sec/Zyklus	
Finale Elongation:	68°C – 7 min	
Kühlen:	4°C – unendlich	

^a Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge der zu amplifizierenden Fragmente

Die Annealing Temperaturen wurden mittels Gradient-PCR ermittelt, und sind, wie auch die Elongationszeiten, für jede Longrange-PCR unterschiedlich.

Annealing Temperaturen: Exon23-26: 60°C
Intron23innen-Intron24außen: 65°C
Intron23innen-Intron24innen: 69°C

Elongationszeiten: Exon 23-26: 10 min (ca. 12,5 kb)
Intron23innen-Intron24außen: 8 min (ca. 7,6 kb)
Intron23innen-Intron24innen: 4 min (ca. 5,7 kb)

Primer: Exon 23: RBg162386se (Bremner et al.)
Exon 26: RBg174526as (Bremner et al.)
Intron23innen: RBg166248se
Intron24aussen: RBg173837as
Intron24innen: RBg171908as

Um die Bruchpunkte von drei Einzelexon-Deletionen des Exons 24 mittels Sequenzierung genau zu bestimmen, war es nötig, den Umfang der deletierten Regionen so genau wie möglich einzugrenzen. Hierzu führten wir zunächst eine Longrange-PCR nach dem von Bremner et al., 1997 publizierten Protokoll durch (Exon 23 bis Exon 26). Danach wurde die

Region der Deletionen durch weitere PCRs mit immer näher um den Deletionsbereich gelegenen Primern eingegrenzt (Intron23innen-Intron24ausen, Intron23innen-Intron24innen).

2.2.8.3 Longrange-PCR mit drei Primern

Die bevorzugte Amplifikation des durch die Deletionen verkürzten Produkts in der PCR an DNA von heterozygoten Mutationsträgern machte die Entwicklung einer Longrange Triplex-PCR mit einem spezifischen Primer für das Wildtyp-Allel erforderlich. Die Lage des Primers für das Wildtyp-Allel wurde in unmittelbarer Nähe zum Exon 24 gewählt. Dieser in Sense-Richtung orientierte Primer erzeugt an RB1 Allelen ohne Exon 24 Deletion in der PCR ein spezifisches Fragment mit dem in Intron 24 gelegenen Antisense-Primer. Als außenliegende Primer zur Amplifikation der durch die jeweiligen Deletionen verkürzten Fragmente wählten wir für diese PCR die Oligos Intron23innen (RBg166248se) und Intron24innen (RBg171908as), zur Amplifikation des Wildtyp-Allels den Zusatzprimer RBg170286se.

Reaktionsansatz für Longrange Triplex -PCR:

Individuelles Reaktionsvolumen: 10 µl
 1 µl 10x Buffer (im Roche Kit enthalten)
 4 µl dNTP's (1,25 mM) = 500 µM Endkonzentration
 0,2 µl RBg166248se (20 µM) = 0,4 µM Endkonzentration
 0,2 µl RBg171908as (20 µM) = 0,4 µM Endkonzentration
 0,2 µl RBg170286se (20 µM) = 0,4 µM Endkonzentration
 0,15 µl Polymerase Mix (im Roche Kit enthalten)
 120 ng genomische DNA

mit H₂O auf 10 µl auffüllen

Cycling Protokoll für Longrange Triplex -PCR:

Initiale Denaturierung:	94 ⁰ C – 2 min	
Denaturierung:	94 ⁰ C – 10 sec	
Annealing:	69 ⁰ C – 30 sec	x10
Elongation:	68 ⁰ C – 4 min	
Denaturierung:	94 ⁰ C – 15 sec	
Annealing:	45 ⁰ C – 65 ⁰ C – 30 sec	x25
Elongation:	68 ⁰ C – 4 min +20 sec/Zyklus	
Finale Elongation:	68 ⁰ C – 7 min	
Kühlen:	4 ⁰ C – unendlich	

2.2.8.4 Gelelution und Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde zur genauen Bestimmung kurzer Deletionen und Insertionen sowie zur Identifikation der Bruchpunkte von drei Deletionen des Exons 24 angewandt. Alle Sequenzierungsreaktionen wurden nach dem Big-Dye Terminator Protokoll (ABI) durch-

geführt. Nach Amplifikation des zu sequenzierenden Bereichs wurde das PCR-Produkt auf Microcon Centrifugal Filter Devices aufgereinigt (Microcon) und Konzentration sowie Länge mittels Gelelektrophorese überprüft. Für die Lokalisierung der Bruchpunkte der Deletionen des Exons 24 wurde vor der Sequenzierung das spezifische Fragment (Intron23innenSense-Intron24innenAntisense siehe oben) nach Gelelektrophorese ausgeschnitten und mit Hilfe des Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) eluiert. Hierzu wurde zunächst das Gelstück mit der Bande in dem Dreifachen seines Volumens an QG-Bindungspuffer aufgenommen und für 10 Minuten bei 14000 U/min auf einem Schüttel-Heizblock inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch auf eine das PCR-Produkt bindende Qiaquick-Silicagelsäule gegeben und eine Minute bei 17 900 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, erneut mit 500 µl QG-Bindungspuffer gewaschen und abzentrifugiert. Danach wurden mit ethanolhaltigem PE-Puffer die Salze ausgewaschen, zweimal je eine Minute bei 19700 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Das aufgereinigte Gel-Eluat wurde daraufhin in 30µl H₂O aufgenommen und durch einminütiges Zentrifugieren bei 19700 g aus dem Silicagel gelöst. Für die Sequenzierung der Deletionsfragmente der drei Exon 24-Deletionen verfahren wir nach dem Prinzip des „Primer-Walking“. Das bedeutet, dass nach den ersten Sequenzierungsreaktionen mit den PCR-Primern (RBg166248se und RBg171908as), die Sequenzierung an dem selben Deletionsfragment mit neu ausgewählten, weiter innen gelegenen Primern (sense-primer: AGG ACA CAA ACA AAT GGA AG, antisense-primer: AAT TTA GGA TGG AAG CTG GT) fortgesetzt wurde, bis das gesamte Deletionsfragment sequenziert war.

Big-Dye-Terminator Protokoll:

Individuelles Reaktionsvolumen: 10 µl
3 µl BigDye Terminator Mix (ABI)
1 µl Primer Forward oder Reverse (5 µM) = 500 nM Endkonzentration

PCR-Produkt je nach Länge zwischen 1 und 100 ng

mit H₂O Bidest (Merck) auf 10 µl auffüllen

Cycling Protokoll für Sequenzierungsreaktion:

Initiale Denaturierung:	96°C – 1 min	
Denaturierung:	96°C – 10 sec	
Annealing:	55°C – 62 °C – 5 sec	x25
Elongation:	60°C – 4 min	
Kühlen	4°C – unendlich	

Die Annealing Temperaturen wurden je nach verwendeten Primern gewählt (Annealingtemperaturen für die einzelnen Primer siehe oben).

Die Produkte der Sequenzierungsreaktion wurden mit Dextran-Blau versetzt, in 0,45 µM Na-Acetat und 70% Ethanol ausgefällt und abzentrifugiert. Das Pellet wurde weitere zwei Male mit 70% Ethanol gewaschen und danach in 20 µl Hi-Dye Formamidlösung (ABI) gelöst und auf einem 3100 Kapillarelektrophoresegerät (ABI) aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte durch die Programme Sequencher (GeneCodes Corporation, Ann Arbor) und DNA-Star Software (DNA-Star Inc., Madison, Wisconsin).

3. ERGEBNISSE

3.1. Quantitative Multiplex-PCR (QMPX-PCR)

3.1.1 Kontrolle und Änderungen des Protokolls der QMPX-PCR

Grundlage des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Protokolls ist das von Richter et al. beschriebene Verfahren zur quantitativen Multiplex-PCR (Richter et al., 2003). Vorversuche an unterschiedlichen DNA-Proben ohne RB1-Mutation zeigten eine hohe Variabilität der Ergebnisse der einzelnen Multiplex Sets. Die Ergebnisse ließen vermuten, dass ein wesentlicher Teil der Variation auf Unterschiede des zur Präparation der eingesetzten Template-DNA verwendeten Extraktionsprotokolls zurückzuführen ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurden DNA-Proben analysiert, die nach unterschiedlichen Methoden – im Einzelfall auch in auswärtigen Labors – aus Tumoren und Blutlymphozyten präpariert worden waren. Des Weiteren waren diese DNA-Proben auch unterschiedlich lange gelagert worden. Da wir auf diese, die Qualität der DNA-Proben beeinflussenden Faktoren, auch durch versuchsweise Aufreinigung mittels Mikrofiltration, keinen Einfluss nehmen konnten, waren Änderungen am originalen PCR-Protokoll erforderlich. Eine deutliche Verminderung der Variation zwischen den Ergebnissen verschieden präparierter Kontrollen konnten wir durch Verwendung eines speziell für die Multiplex-PCR entwickelten PCR-Kits der Firma Qiagen erreichen (s. Abb. 7)

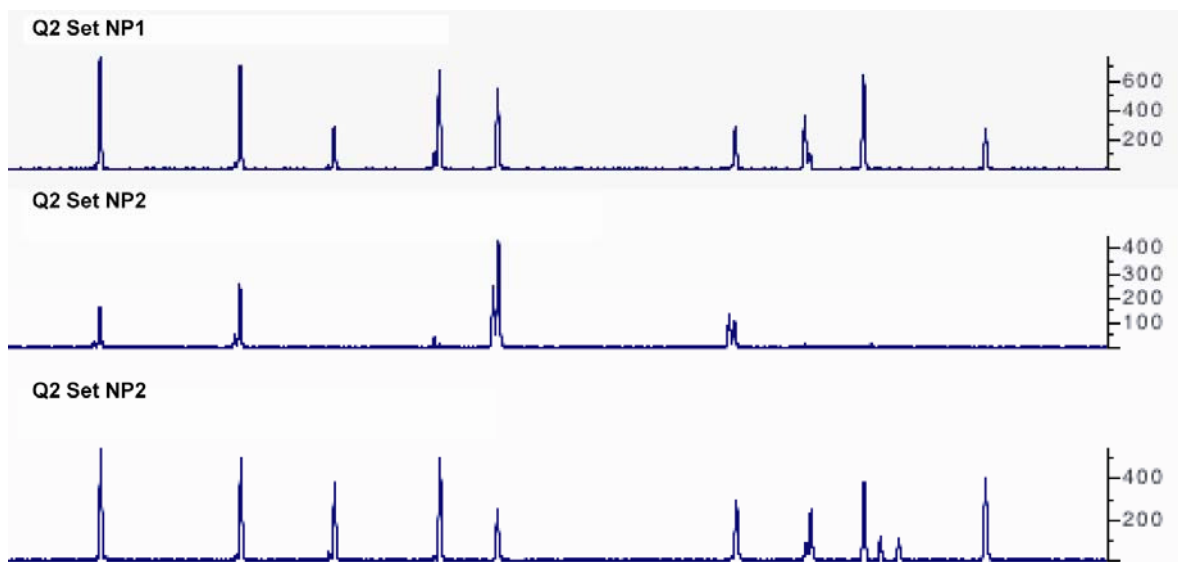


Abb. 7: Ergebnisse der Multiplex-PCR (Q2 Set) an DNA-Proben von verschiedenen Normalpersonen (NP1 und NP2) und mit unterschiedlichen PCR-Bedingungen. Die oberste Spur zeigt ein zufriedenstellendes Ergebnis bei Normalperson 1 nach dem ursprünglichen Protokoll. Spur 2 zeigt ein, bei gleichen PCR-Bedingungen, schlechtes Ergebnis für die DNA-Probe von Normalperson 2. Spur 3 zeigt ein gutes Ergebnis für die gleiche DNA-Probe wie in Spur 2 unter Verwendung des Multiplex-PCR Protokolls der Firma Qiagen.

Eine weitere Variation betraf die Effizienz der Amplifikation für einzelne Produkte in einer Multiplex-Reaktion. Die daraus folgenden Unterschiede der Produktmengen konnten wir durch Anpassen der Primerkonzentration vermindern (Exon 20, Exon 22 und Exons 15/16).

Für das Produkt der Region Exon 15/16 konnte trotz Erhöhung der Primerkonzentration nur eine geringe relative Produktmenge erreicht werden. Eine von uns durchgeführte Sequenzanalyse (NCBI-BLAST) zeigte, dass der im Originalprotokoll von Richter et al. angegebene sense-Primer für das Exon 15 (M5X15.16) noch an viele andere Stellen im humanen Genom hybridisieren kann. Dies ist eine mögliche Erklärung für die geringen Produktmengen des Exon 15/16 in der Multiplex-PCR. Wir haben daher eine andere Sequenz für diesen Sense-Primer ausgewählt (gegen Rb15li) und erzielten mit diesem deutlich höhere relative Signalintegrale.

Ein weiterer Punkt der Optimierung betraf die Produkte für Exon 4 und Exon 21 im Multiplex-Set Q3. Die Primer für diese Regionen waren im Originalprotokoll so gewählt, dass die Produkte eine um ein Basenpaar verschiedene Länge hatten. Um die Unterscheidbarkeit der Produkte zu verbessern, wählten wir einen neuen Antisense-Primer für Exon 4 (Rb4ire).

Zusätzliche Verbesserungen waren in Bezug auf die internen Amplifikationskontrollen erforderlich. Im Originalprotokoll ist als interner Standard eine Region im Retinaldehyd-Gen auf Chromosom 15 vorgesehen. Das PCR-Produkt dieser Region zeigte in unseren Analysen an Kontroll-Proben eine deutliche Varianz der Produktmenge zwischen den verschiedenen Multiplex-Sets. Daher haben wir ein weiteres Primerpaar zur Amplifikation eines zweiten internen Standards mit aufgenommen (SHGC-78148 / K10 B, spezifisch für eine Region auf Chromosom 10). Durch den Einsatz von zwei Standards war es uns möglich, die Resultate wechselseitig zu überprüfen. Abbildung 8 zeigt Beispiele typischer Ergebnisse der QMPX-PCR an DNA aus Blut und Tumor von unterschiedlichen Deletionen im RB1-Gen.

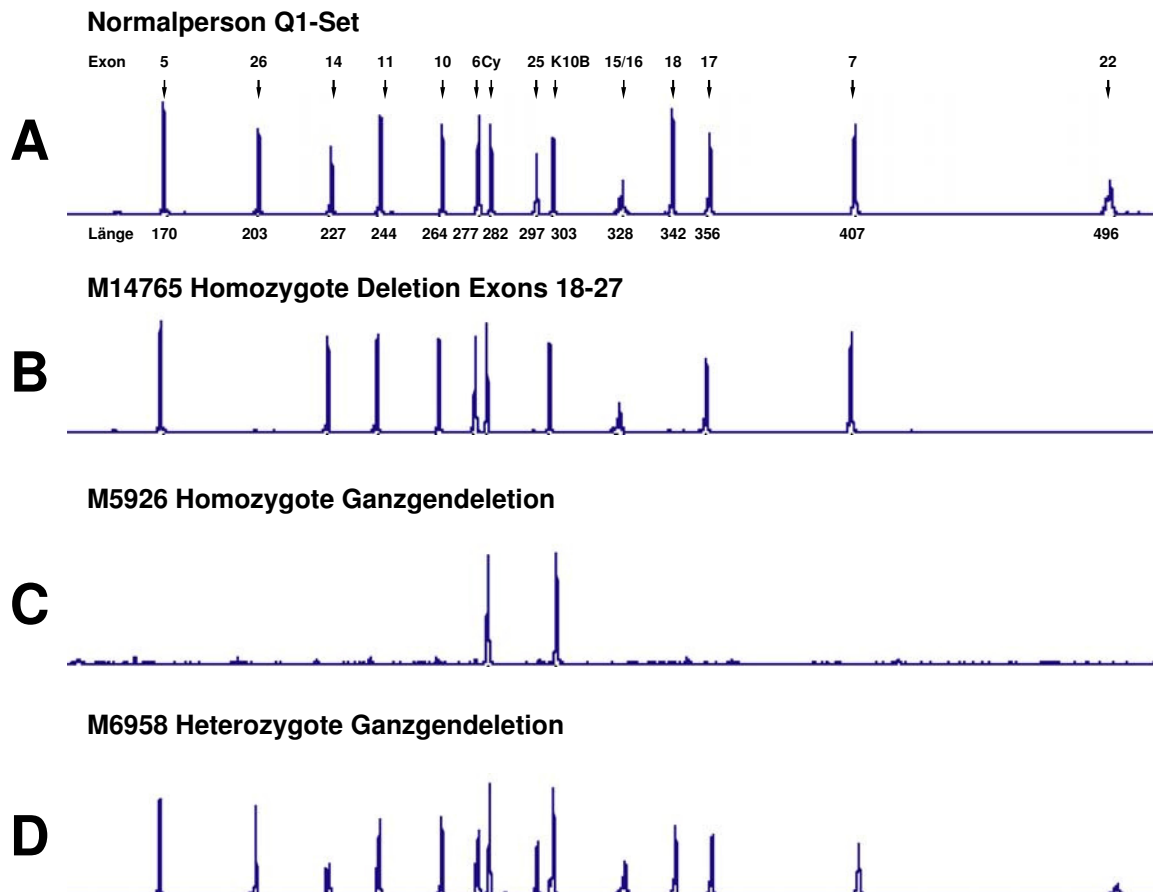


Abb. 8: Die Abbildung zeigt typische QMPX-PCR-Ergebnisse (Q1-Set) bei Proben mit *gross deletions* im Vergleich mit einer Kontrolle. **A** Ergebnis für eine Normalperson; die einzelnen Exons und Längen der PCR-Produkte sind markiert. **B** Ergebnis für DNA aus Tumormaterial von M14765 mit homozygoter Deletion der Exons 18 bis 27. Die Signale für alle Exons des deletierten Bereiches im Q1-Set fehlen (Exons 26, 18 und 22). **C** Bei der homozygoten Ganzgendeletion in Tumor-DNA von Patient M5926 fehlen alle Integrale außer denen der internen Standards (K10B und Cy). **D** Bei der heterozygoten Ganzgendeletion in Blut-DNA von Patient M6958 fällt auf, dass die Integrale für alle Exons des RB1-Gens gegenüber den internen Standards erniedrigt sind.

3.1.2 Verbesserung des Auswertungsalgorithmus für die QMPX-PCR

Nach dem Originalprotokoll erfolgte die Auswertung der Multiplex-PCR nach folgenden Schritten: 1.) die Signalintegrale der PCR-Produkte der einzelnen Zielregionen (Exons des RB1) wurden auf das Signalintegral des internen Standards von Chromosom 15 (Cy) bezogen; 2.) dieser Quotient wurde für jede Zielregion mit dem Konfidenzintervall der Normalkontrollen (Gendosis=2) verglichen (Richter et al., 2003). Regionen mit relativen Signalintegralen unterhalb des jeweiligen Konfidenzintervalls wurden als deletiert gewertet.

In Anbetracht der hohen Variabilität der Produktmengen des internen Standards (Cy: Exon 4 des Retinaldehydens auf Chromosom 15) entwickelten wir eine alternative Methode.

Nach fachlicher Beratung durch Herrn Dr. med. Dipl. math. Stefan Böhringer entschieden wir uns dafür, das Signalintegral des PCR-Produkts jedes einzelnen Exons auf die Summe aller Signalintegrale der jeweiligen Multiplex-PCR Reaktion zu beziehen. Die Menge an PCR-Produkt jedes Exons wurde also in seinen Anteil an der Summe aller PCR-Produkte der Multiplex-PCR transformiert. Durch Normierung dieser Werte über die durchschnittlichen Werte bei Normalpersonen für die jeweiligen Exons war im Falle einer normalen Gendosis ein Wert um 1 zu erwarten.

Durch Anwendung dieser Rechenvorschrift konnten wir die Unterscheidbarkeit zwischen Proben mit Deletionen und Proben ohne Gendosisveränderung verbessern, da im Falle von Deletionen nicht nur die Werte für die deletierten Exons erniedrigt, sondern gleichzeitig auch die Werte der nicht deletierten Exons, die ja nun einen größeren Anteil an der Summe der Signalintegrale der PCR-Reaktion ausmachten, erhöht dargestellt wurden (s. Abb. 9).

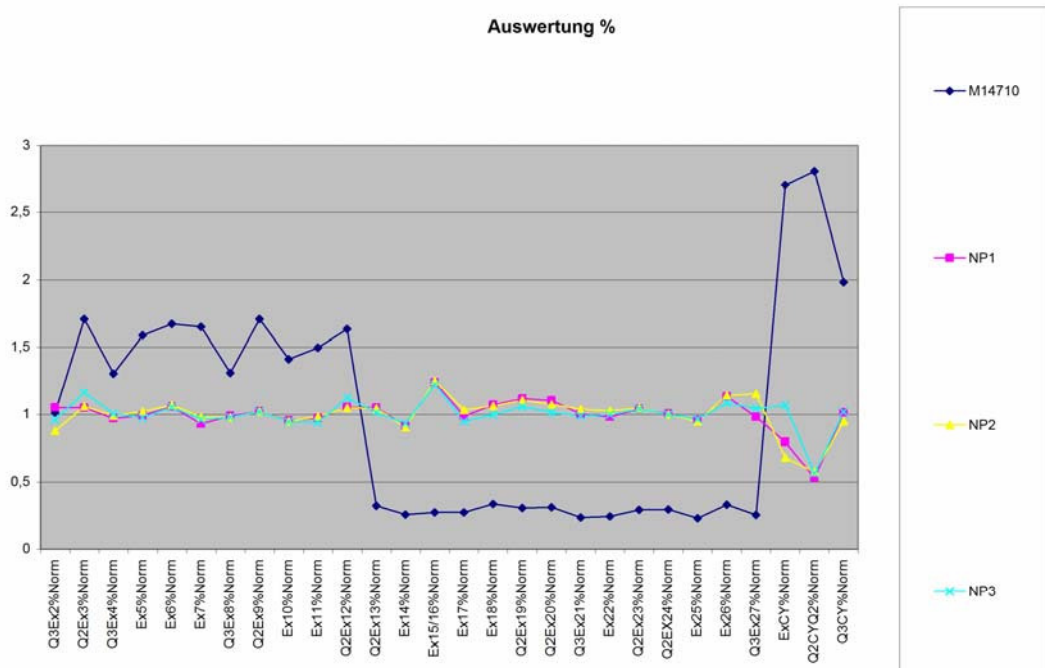


Abb. 9: Die Probe M14710 zeigt eine homozygote Deletion der Exons 13 bis 27. Demnach ist der relative Anteil der nicht deletierten Exons und internen Standards an der (durch die große Deletion geringen) Gesamtsumme aller Signalintegrale erhöht, was sich als scheinbare Erhöhung gegenüber den Durchschnittswerten bei Normalpersonen (NP) darstellt (durchschnittlicher Wert über 1,5). Die für eine homozygote Deletion hoch erscheinenden Signalintegrale der deletierten Exons lassen sich durch minimale Amplifikation von Resten konstitutioneller DNA im Tumorgewebe, erklären, die bei der niedrigen Gesamtsumme aller Signalintegrale trotzdem noch einen Anteil von ca. 30 % des Wertes bei Normalpersonen ausmachen.

Ein Nachteil dieser Herangehensweise besteht darin, dass Deletionen oder Insertionen des ganzen RB1-Gens nur durch erhöhte oder erniedrigte relative Anteile des internen Standards auf Chromosom 15 (CY) erkannt werden können (s. Abb. 10).

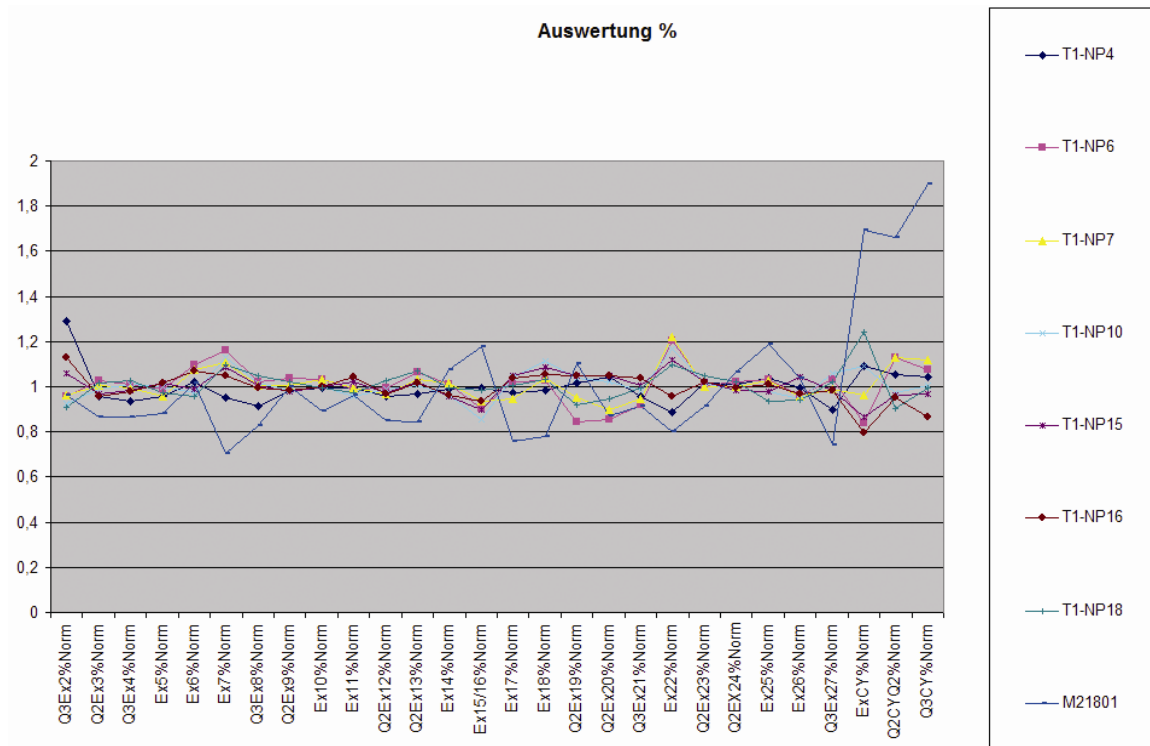


Abb. 10: Die heterozygote Ganzgendeletion in konstitutioneller DNA von Patient M21801 fällt nach der statistischen Auswertung nur durch eine relative Erhöhung der Anteils der Signalintegrale des internen Standards an der Summe aller Signalintegrale auf.

Um den Einfluss der hohen Variabilität der relativen Produktmenge dieses internen Standards auf die Erkennung dieser Veränderungen zu vermindern, führten wir eine weitere interne Kontrolle (Primerpaar SHGC-78148 / K10B) in alle Multiplex Sets ein. So konnten Veränderungen der RB1-Gendosis besser erkannt werden (s. Abb. 11). Die Methode zur Auswertung wurde entsprechend angepasst: Die Signalintegrale der Produkte der einzelnen Regionen (Exons) wurden zuerst auf die Signalintegrale des ersten und danach auf die Signalintegrale des zweiten internen Standards bezogen. Diese Auswertungsvorschrift ergab zwei Datensätze für jedes Multiplex Set: Einer bezogen auf den Cy-Standard auf Chromosom 15 und ein zweiter bezogen auf den K10B-Standard auf Chromosom 10. Nach Normierung auf die Ergebnisse an Kontroll-DNA erhielt man bei normaler Gendosis (2 Kopien) einen Wert von 1, im Falle einer hemizygoten Deletion (1 Kopie) einen Wert von 0,5 und im Falle einer homozygoten Deletion den Wert 0. Insertionen führten zu Werten größer als 1.

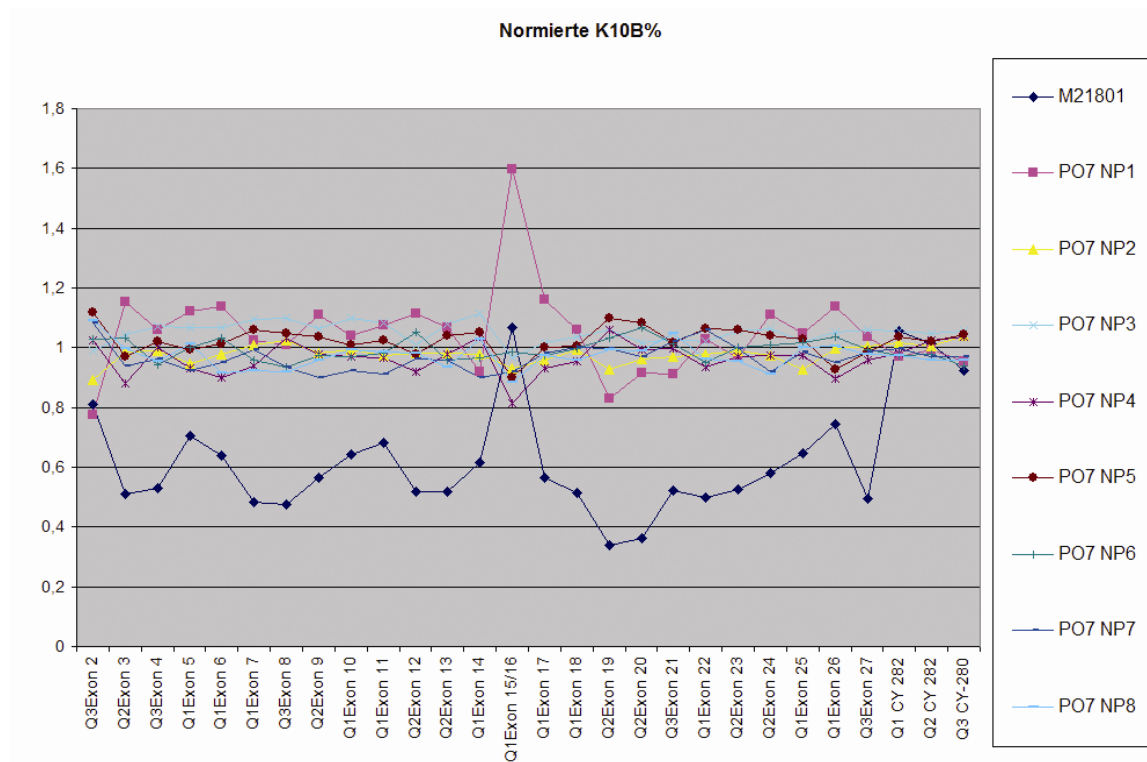


Abb. 11: Die gleiche heterozygote Deletion wie in Abb. 5 (Blut-DNA von Patient M21801) stellt sich bei Bezug der einzelnen Signalintegrale auf den internen Standard K10B besser dar als bei Bezug der Signalintegrale auf ihre Gesamtsumme (vergl. Abb. 5). Die korrekte Amplifikation des Bezugsstandards (K10B) lässt sich direkt an den Werten für den anderen internen Standard (Cy) überprüfen. Die relativ hohen Werte für Exons 15/16 werden durch die große Variation der Produktmengen dieser Reaktion bedingt.

Mit dieser Auswertungsmethode konnte die Erkennung von Deletionen oder Insertionen des gesamten RB1-Gens erheblich verbessert werden.

3.1.3 Analysen zur Bestätigung der QMPX-PCR-Ergebnisse

Die statistische Auswertung ergab für jeden Patienten zwei Datensätze bestehend aus Werten für jedes Exon und die internen Kontrollen (jeweils bezogen auf die andere interne Kontrolle). Anhand dieser Werte sollte der Mutationsstatus für jedes einzelne Exon erkannt werden. Im Fall von „klaren“ Ergebnissen, z.B. 0,5 für heterozygote Deletionen oder 1 für Abwesenheit einer Deletion, war dies einfach. Bei Werten, die zwischen diesen „klaren“ Ergebnissen lagen, ist eine definitive Aussage über die Kopienzahl des betreffenden Exons ohne andere Analysen nicht möglich. Da solche „unklaren“ Ergebnisse, vermutlich aufgrund variabler DNA-Qualität, immer wieder auftreten können, mussten für die diagnostische Anwendung bei Patienten weitere Verfahren zur Bestätigung der quantitativen Multiplex- Ergebnisse etabliert werden.

Am einfachsten und sichersten zu beurteilen sind kleine intraexonische Insertionen und Deletionen. Im Fall von Heterozygotie erhält man in diesem Fall ein zusätzliches (längeres oder kürzeres) Fragment in der quantitativen Multiplex-PCR, wobei sowohl die Signalintegrale für das „normale“ als auch für das „mutierte“ Fragment auf die Hälfte des Wertes bei Normalpersonen erniedrigt sind (s. Abb. 12).

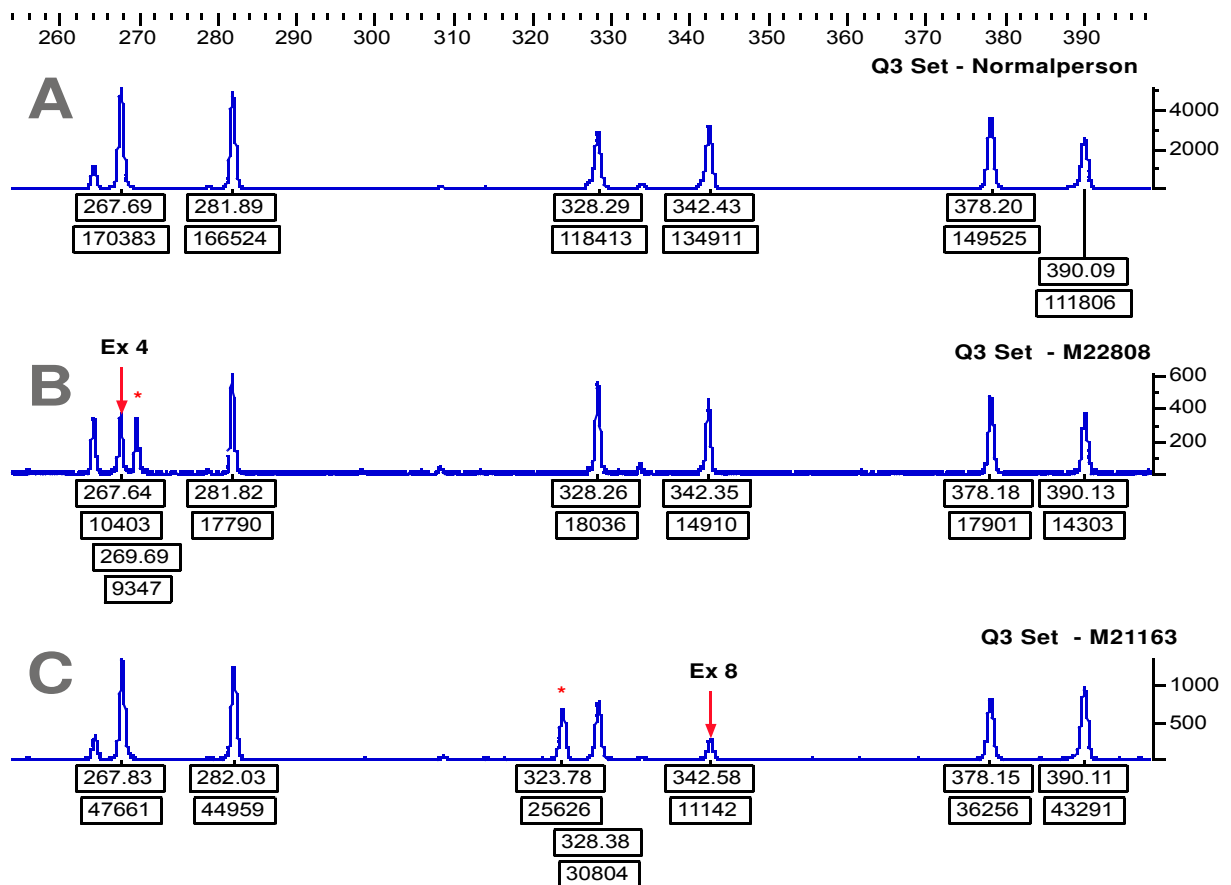


Abb. 12: QMPX Ergebnisse (Q3 Set) für **A** eine Normalperson, **B** Tumor DNA des Patienten M22808 mit 2 bp Insertion in Exon 4 und **C** Tumor DNA des Patienten M21163 mit 19 bp Deletion in Exon 8. Das Wildtyp-Signal des deletierten Exons ist jeweils mit einem Pfeil, das von dem mutierten Allel stammende Signal mit einem Sternchen markiert. In Abbildung C sieht man den Effekt der präferentiellen Amplifikation kürzerer Fragmente, der dazu führt, dass das kürzere deletierte Fragment ein größeres Signalintegral aufweist als das Signal des Wildtypallels.

Im Fall einer homozygoten intraexonischen Längenalteration erhält man nur ein Fragment von abweichender Länge. Statistische Auswertungen zur Bestimmung der Gendosis sind für die Feststellung dieser Mutationen nicht notwendig, da sie direkt anhand des abnormen Signal-Musters nach der quantitativen Multiplex-PCR auffallen. Sie wurden aber trotzdem durchgeführt, um zusätzliche Exon-Deletionen nicht zu übersehen.

Alle mittels quantitativer Multiplex-PCR detektierten intraexonischen Längenalterationen konnten mit Hilfe direkter Sequenzierung des auffälligen Bereichs bestätigt werden.

3.2 Entwicklung eines Algorithmus zum Screening auf RB1 Mutationen

Richter et al. (2003) konnten zeigen, dass eine genetische Diagnostik in Familien mit Retinoblastom ökonomisch vorteilhaft ist, da durch einen Risikoausschluss teure und für die Patienten belastende klinisch-ophthalmologische Untersuchungen vermieden werden können. Für eine möglichst effektive Kostensenkung und für eine, in Bezug auf den Patienten optimierte Betreuung muss molekulargenetische Diagnostik schnell und sicher sein. Diese Forderungen können nur durch ein effizientes Ineinandergreifen der verschiedenen Screening- und Bestätigungsmethoden erfüllt werden, bei dem die schnellsten und preisgünstigsten Screening-Methoden zur Erkennung eines Großteils der Mutationen am Anfang stehen sollten, bevor aufwändigere Methoden zum Nachweis seltener Mutationen (wie z.B. Methylierungsanalyse) oder spezifischen Bestätigungsmethoden (z.B. Longrange-PCR, Realtime-PCR und Sequenzierung) eingesetzt werden.

Als ein Ergebnis der vorliegenden Arbeit konnte die quantitative Multiplex-PCR mit den entwickelten Bestätigungsmethoden etabliert und in das zuvor bestehende Screening-Programm integriert werden. So entstand ein neuer Algorithmus zum Screening auf Mutationen im RB1-Gen in der Routine (Abb. 13).

Neu eintreffende DNA-Proben werden zunächst mittels der sehr günstigen und schnell durchführbaren Methode der STR-Analyse allelotypisiert. Im Falle von Tumormaterial liefert diese Untersuchung bei informativen Loci Auskunft über eventuellen Allelverlust (LOH), im Falle von Blut-DNA möglicherweise Hinweise auf eine eventuelle Ganzgendeletion. Im Anschluss an diese Analyse wird die quantitative Multiplex-PCR durchgeführt, wodurch Längenalterationen von einem Basenpaar- bis hin zu Ganzgendeletionen oder –Insertionen detektiert werden können. Abhängig von dem Ergebnis schließt sich die Bestätigung einer gefundenen Mutation mittels Sequenzierung, Realtime-PCR oder Longrange-PCR an oder es folgt ein Screening auf Punktmutationen (DHPLC) bzw. Zytogenetische- oder Methylierungs-Analysen.

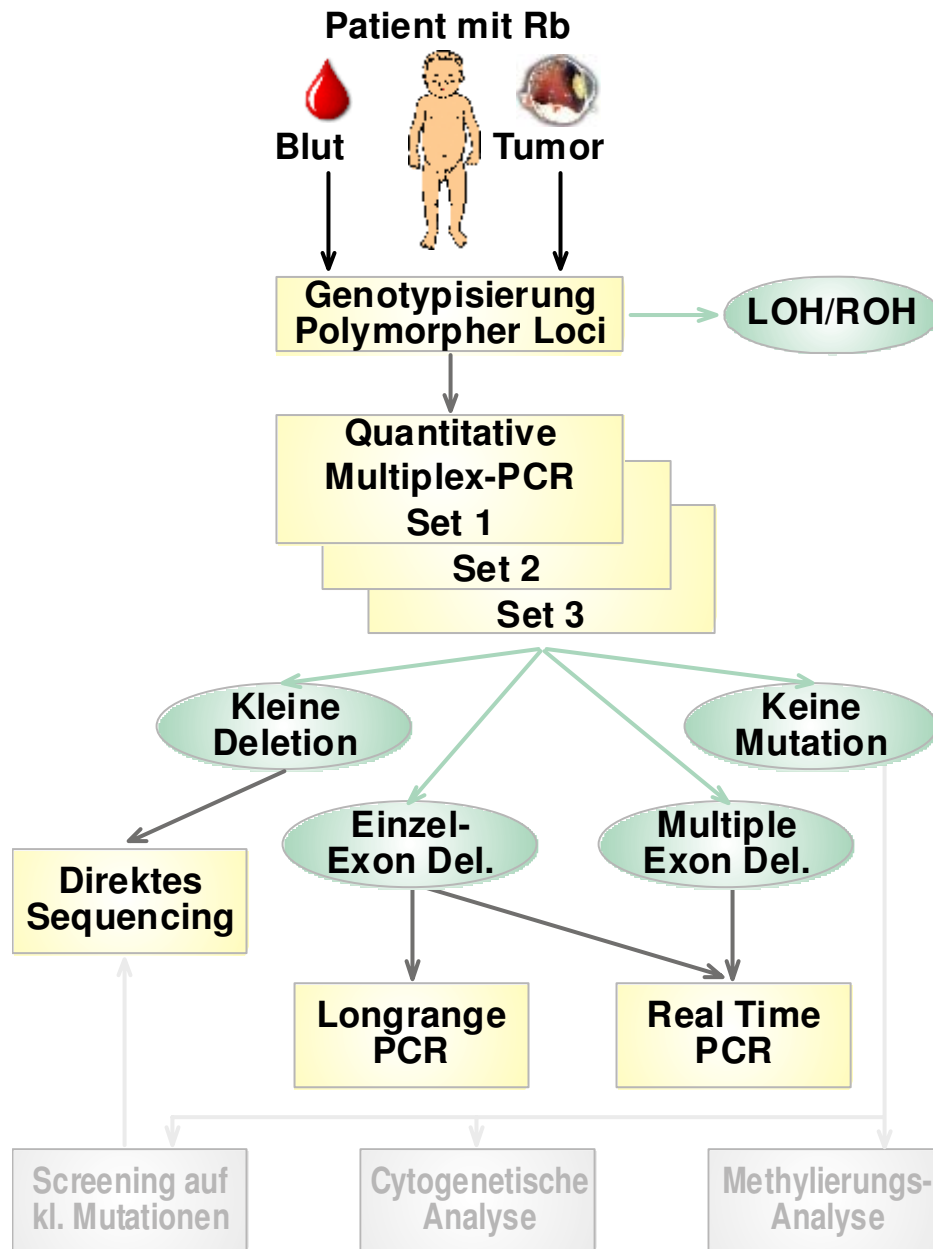


Abb. 13: Flussdiagramm des Algorithmus zum Screening auf RB1 Mutationen

Nach STR-Allelotypisierung folgt die QMPX-PCR Analyse und abhängig vom Ergebnis die Bestätigung durch Sequenzierung, Realtime-PCR oder Longrange-PCR bzw. bei negativem Befund weitere Untersuchungen auf kleine Mutationen, anormale Methylierung oder zytogenetisch detektierbare Veränderungen. (LOH, *loss of heterozygosity*; ROH, *retention of heterozygosity*)

3.3 Identifikation von Mutationen bei Patienten mit Retinoblastom

Mittels QMPX-PCR wurden insgesamt 129 Patienten untersucht. In DNA aus Blut von 26 von 57 (46 %) Patienten mit hereditärem- und 6 von 72 (8.3 %) Patienten mit isoliertem unilateralem Retinoblastom wurden so Mutationen im RB1-Gen identifiziert. Hinzu kommen 32 RB1-Veränderungen in DNA aus Tumormaterial von 31 von 72 (43 %) Patienten mit

isoliert unilateralem Retinoblastom, die nicht in DNA aus Blut nachweisbar waren und daher auf somatische Mutationen zurückzuführen sind.

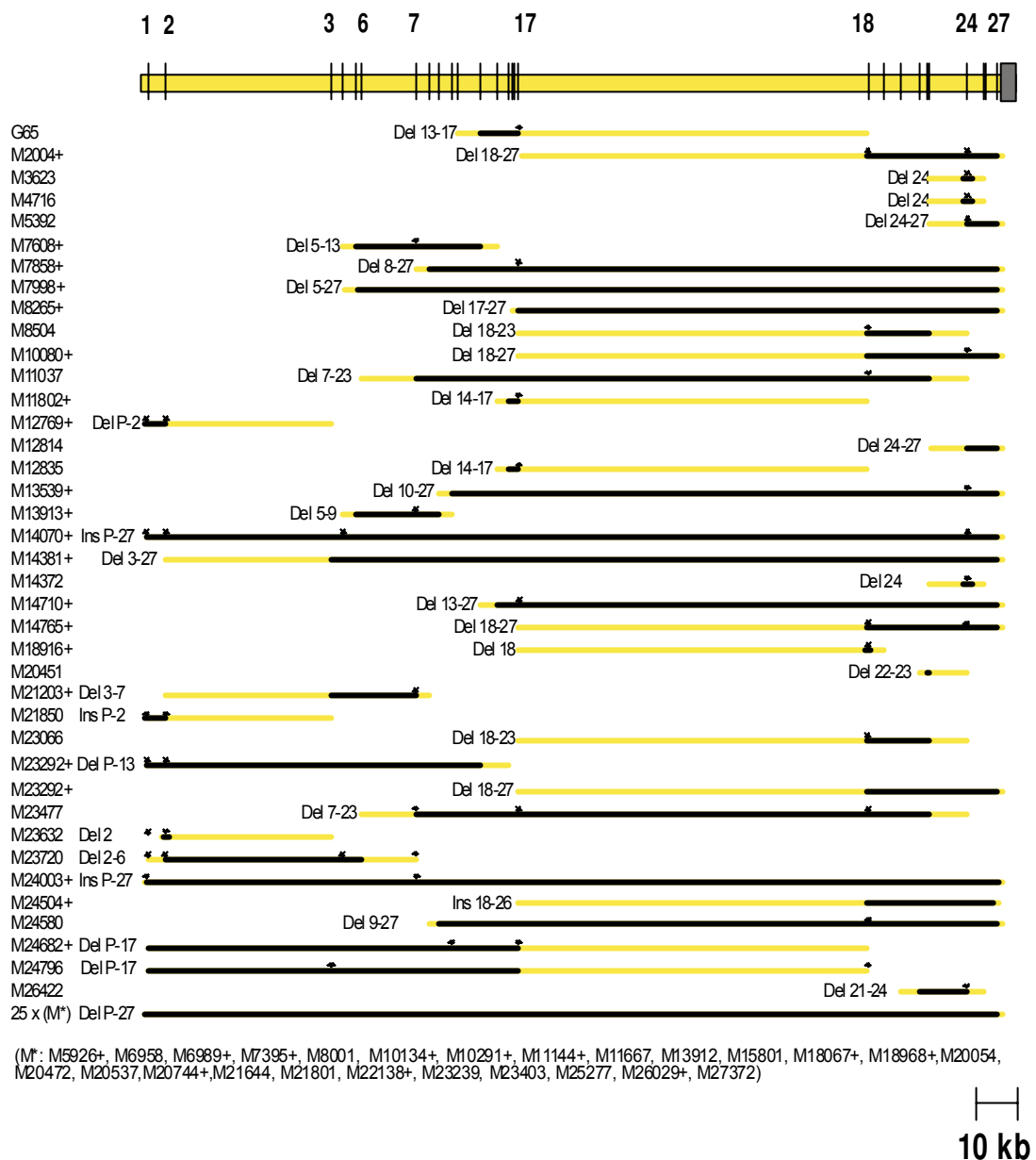


Abb. 14: Die Abbildung zeigt eine graphische Darstellung des RB1-Gens und darunter die Ausdehnung der identifizierten intragenen Deletionen oder Insertionen. Die vertikalen Balken zeigen die Lokalisation der einzelnen Exons, wovon einige durch Zahlen gekennzeichnet sind. Horizontale schwarze Balken zeigen das gesicherte Ausmaß der identifizierten Deletionen/Insertionen, während die gelben horizontalen Balken die mögliche Lokalisation der Bruchpunkte darstellen. Somatische Deletionen, die nur in Tumor DNA beobachtet wurden, sind durch + am Ende der M-Nummer gekennzeichnet. Sternchen kennzeichnen Exons, deren Gendosis durch Realtime-PCR bestätigt wurde.

3.3.1 Deletionen des gesamten RB1-Gens

Analyse von DNA aus Blut

Bei 14 Patienten mit hereditärem Retinoblastom zeigte die QMPX-PCR an Blut-DNA eine Reduktion der relativen Signalintegrale aller exonspezifischen PCR-Produkte des RB1-Gens um die Hälfte. Dieses Analyseergebnis entspricht einer heterozygoten Deletion des gesamten Gens (Deletion eines RB1-Allels). Bei allen Patienten wurden die durch QMPX-PCR gefundenen Deletionen durch unabhängige Methoden bestätigt: Bei 13 Patienten mittels Realtime-PCR und bei einem Patienten durch zytogenetischen Nachweis einer Deletion der chromosomalen Region des RB1-Gens. Bei allen Patienten ist das Vorliegen einer Deletion eines RB1-Allels auch mit den Ergebnissen der vorher durchgeführten STR-Genotypisierung vereinbar, das heißt die Patienten sind hemizygot für die intragenen STR-Polymorphismen RBi2 und RB1.20 (siehe 2.1.6).

Analyse von DNA aus Tumorproben

Die QMPX-Analyse zeigte, dass 13 von 43 (30 %) Tumore von Patienten mit isoliert unilateralem Retinoblastom und LOH im Tumor eine Deletion eines RB1-Allels aufweisen. Diese 13 Tumoren sind jedoch nur die, bei denen zuvor zusätzlich zu LOH keine kleine intragene Mutation gefunden wurde. In diesen Tumoren sind also die zu LOH führenden genetischen Veränderungen mit einer Deletion eines RB1 Allels verbunden (z.B. durch Non-disjunction oder interstitielle Deletion). Es ist zu erwarten, dass sich unter den gesamten 262 Tumoren des in Essen gesammelten Kollektivs weitere Tumoren mit Deletion eines RB1 Allels befinden. Um die dadurch zu erwartende Verzerrung der Zahlen vermeiden, wurden die zu LOH führenden Deletionen eines RB1-Allels in Tumoren nicht in die Aufstellung zur Mutationshäufigkeit einbezogen.

Die QMPX-Analyse zeigte bei 11 von 22 Tumorproben ohne LOH intragener Marker eine Deletion beider Allele des RB1 (homozygote Deletion). Bei allen 11 Tumorproben wurde der homozygote Verlust beider RB1-Allele durch Realtime-PCR als unabhängige Methode bestätigt. Der anscheinend paradoxe Befund von fehlendem Allelverlust in der STR-Allelotypisierung dieser Proben ist durch die Amplifikation geringer Mengen konstitutioneller DNA zu erklären, die in jeder Tumor-DNA-Probe als Kontamination vorhanden ist (z.B. aus endothelialen Zellen und Blutlymphozyten im Tumorstroma). Bei keinem der 11 Patienten mit isoliert unilateralem Retinoblastom und Deletion beider RB1-Allele im Tumor konnte eine RB1-Gen Deletion in konstitutioneller DNA nachgewiesen werden. Diese Deletionen sind daher bei allen 11 Patienten das Ergebnis somatischer Mutationen.

3.3.2 Deletionen mit einem Bruchpunkt im RB1-Gen

Analyse von DNA aus Blut

In DNA aus Blutlymphozyten von 5 Patienten (M5392, M12814, M23720, M24580, M24796) konnten wir große Deletionen (gross deletionen) identifizieren, bei denen einer der beiden Bruchpunkte in einem Intron des RB1-Gens lokalisiert ist (Abb. 14). Drei dieser Deletionen betrafen das 3'-Ende des Gens (M5393, M12814, M24580). Nur eine der 3'-End-Deletionen erfasste auch Bereiche, die für die funktionellen A/B-Pocket Domänen des RB1 kodieren (M24580).

Analyse von DNA aus Tumorproben

Die Analyse von Tumor-DNA isoliert einseitig betroffener Patienten führte bei 10 Proben zur Erkennung von Deletionen mit einem Bruchpunkt im RB1-Gen: Drei Tumoren (M24682, M12769, M23292) mit Deletionen des 5' Endes und 10 Tumorproben mit Deletion des 3' Endes (M13539, M14710, M8265, M2004, M10080, M14765, M23292, M14381, M7998, M7858). Alle Deletionen waren vereinbar mit dem zuvor durch STR-Analyse bestimmten Muster des Allelverlustes intragener Marker.

3.3.3 Deletionen mit beiden Bruchpunkten im RB1-Gen

Analyse von DNA aus Blut

Deletionen mit beiden Bruchpunkten innerhalb des RB1-Gens (intragene Deletionen) wurden in konstitutioneller DNA von 13 Patienten (G65, M12881, M8504, M23066, M23632, M26422, M20451, M13913, M3625, M4716, M14400, M11037, M23477) identifiziert (Abb.14).

Alle bis auf eine dieser Deletionen wurden durch Realtime-PCR bestätigt. Die Ausnahme betrifft einen Hinweis auf eine Deletion der Exons 22 und 23 bei Patient M20451, für die wir aus Kostengründen keinen gesonderten Realtime-PCR Assay entwickelt haben. Dieser Patient hat jedoch ein familiäres Retinoblastom und mittels QMPX-PCR an Blut-DNA konnte die identische Mutation auch in konstitutioneller DNA bei zwei betroffenen Verwandten nachgewiesen und damit unabhängig bestätigt werden.

Bei zwei Patienten mit intragenen Deletionen (M11037, M23477) zeigen die Ergebnisse der STR-Allelotypisierung und der Realtime-PCR, dass die Mutationen im Mosaik vorliegen. Das heißt Patienten sind nicht heterozygot für die Deletionen.

Analyse von DNA aus Tumorproben

In DNA aus Tumormaterial von fünf Patienten (M11802, M18916, M21203, M7608, M13913) wurden durch QMPX-PCR mit Bestätigung durch Realtime-PCR intragene

Deletionen des RB1-Gens identifiziert. Diese Veränderungen waren nicht in konstitutioneller DNA der jeweiligen Patienten nachweisbar und sind daher das Ergebnis somatischer Mutationen.

Weitere Analysen bei Deletionen einzelner Exons des RB1-Gens

Von den insgesamt 82 identifizierten RB1-Deletionen sind fünf (6,1 %) Deletionen einzelner Exons:

- konstitutionelle Deletion Exon 24: M14400, M4716, M3625
- konstitutionelle Deletion Exon 2: M21851
- Deletion Exon 18 in Tumor-DNA: M18916

Insgesamt wurden durch die QMPX-PCR bei mehr Proben Hinweise auf Deletion eines einzelnen Exons erhalten. Da diese Methode für einzelne Exons Werte ergeben kann, die keine eindeutige Zuordnung (heterozygote Deletion oder experimentelle Variation) erlaubt, sind zur Bestätigung unabhängige Analysemethoden erforderlich. Zusätzlich zur Realtime-PCR entwickelten wir dazu Longrange-PCR Assays speziell zur Überprüfung von Hinweisen auf Einzelexon-Deletionen.

Mittels eines Longrange-PCR-Assays (Bremner et al., 1997) haben wir Einzelexon-Deletionen der Region des Exon 24, die sowohl in QMPX als auch Realtime-PCR eindeutig identifiziert wurden (weniger als 30% des Wertes bei Normalpersonen in Tumormaterial und um 50 % in DNA aus Blutlymphozyten), genauer charakterisiert. Die insgesamt fünf untersuchten Proben stammten von 3 verschiedenen Patienten: Drei DNA Proben aus Blutlymphozyten (zwei Patienten mit sporadisch bilateralem Retinoblastom [M14400, M4716], ein Patient mit sporadisch einseitigem Retinoblastom [M3625]) sowie zwei DNA-Proben aus Tumormaterial von zwei dieser Patienten (M14400, M3625). In allen diesen Proben konnten Deletionsfragmente durch PCR und Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Mit drei zusätzlichen, näher am Exon 24 hybridisierenden PCR-Primern (RBg166248se, RBg171908as und RBg173837as) konnten die bei den Patienten jeweils deletierten Regionen weiter eingegrenzt werden (s. Abb. 17).

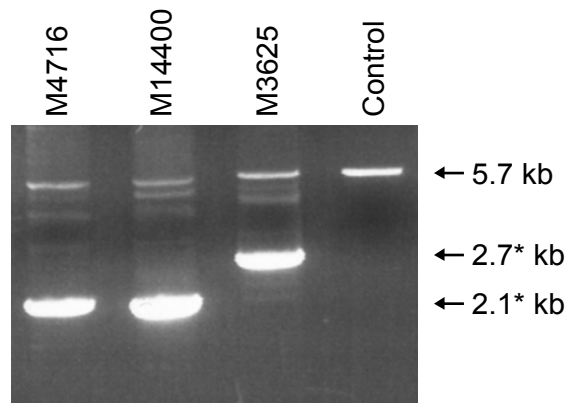


Abb. 15: Longrange-PCR mit den Primern RBg166248se und RBg171908as (für die Primerlokalisierung vergleiche Abb. 17). Die Longrange-PCR an DNA der Normalperson (Control) zeigt nur die erwartete Wildtyp-Bande bei 5,7 kb. Alle drei Patienten (DNA aus Blutlymphozyten von M4716 und Tumor-DNA von Patienten M14400 und M3625) zeigen zusätzlich kleinere Deletionsfragmente (mit Sternchen markiert).

Vermutlich aufgrund bevorzugter PCR-Amplifikation des kürzeren PCR-Produkts (entsprechend dem mutierten Allel) wurden die PCR-Produkte der normalen Allele nur in geringerem Anteil erzeugt. Wir entwickelten daher eine drei-Primer-PCR, um eine quantitativ ausgeglichene Amplifikation der Produkte des normalem und des mutierten Allels zu erreichen (s. Abb. 16).

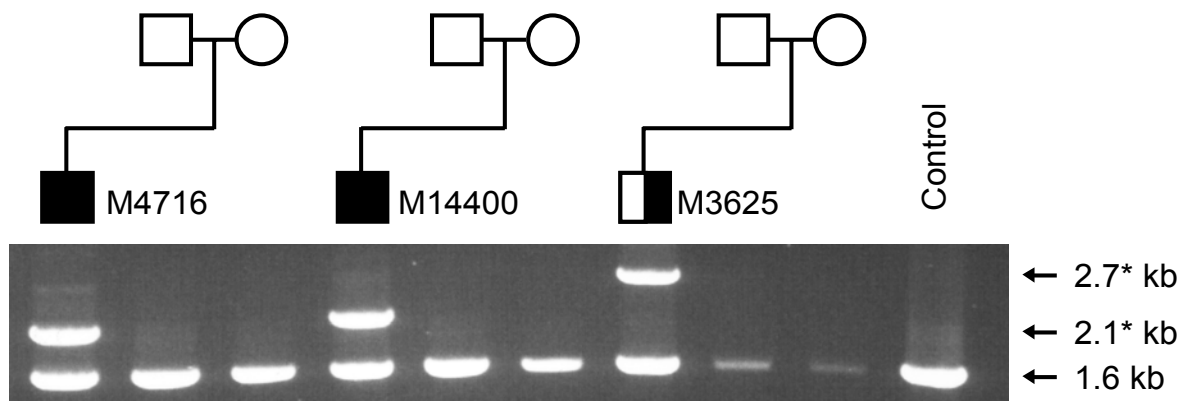


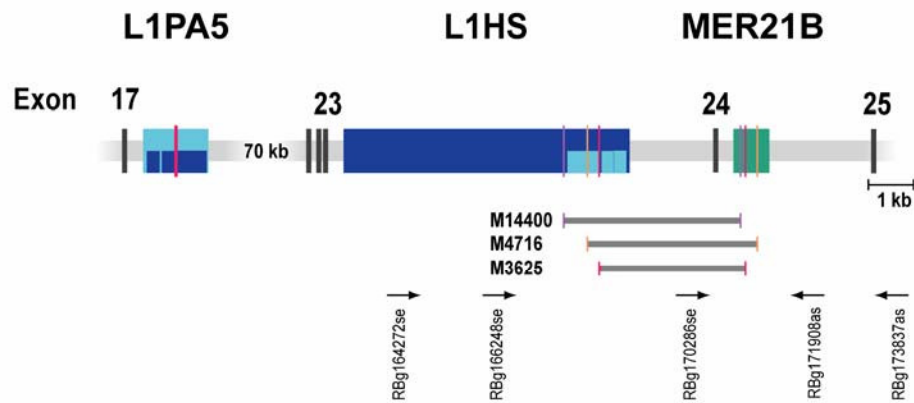
Abb. 16: Drei-Primer-PCR mit denselben Primern wie in Abb. 15 und zusätzlich RBg170286se (vergl. Abb. 17). Das kurze Fragment von 1,6 kb entspricht dem Wildtyp Allel und wird zwischen dem Antisense-Primer RBg171908as und dem in der deletierten Region lokalisierten Sense-Primer RBg170286se amplifiziert. Die längeren Deletionsfragmente entsprechen denen in Abb. 15 und werden nur bei den Patienten (Blut DNA von M4716, M14400 und M3625) beobachtet. Aufgrund der präferentiellen Amplifikation kürzerer Fragmente stellt sich das 5,7 kb lange Wildtyp-Fragment (vergl. Abb. 15) auf dem Gel nicht dar.

Mit diesem Assay konnten wir also zeigen, dass die Deletionen bei den drei Patienten neu aufgetreten sind, da die Mutationen in DNA-Proben aus Blutlymphozyten der jeweiligen Eltern nicht nachweisbar waren (s. Abb. 16). Es konnte so auch bestätigt werden, dass die beiden untersuchten Tumoren homozygot für die in Blutlymphozyten der jeweiligen Patienten nachgewiesenen Mutationen sind.

Auf posttranskriptioneller Ebene ist die höchstwahrscheinliche Folge aller drei Deletionen der Verlust des 31 bp umfassenden Exons 24, was zu einem *frame-shift* mit vorzeitigem Stopp-Kodon 8 Triplets downstream im Exon 25 führt. Splice-Site Mutationen im Bereich von Intron 24, die zu identischen mutanten Transkripten führen, wurden bereits bei Patienten mit familiärem bilateralem Retinoblastom beschrieben (Lohmann, 1999). Daher ist mit hoher Sicherheit davon auszugehen, dass die hier beobachteten Deletionen ursächlich für die Retinoblastomerkrankung der Patienten sind.

Durch schrittweise Annäherung an die Deletionsbruchpunkte und mit in jedem Schritt neuen Primern für die direkte Sequenzierung (Primer-Walking) konnten wir die Bruchpunkte der Deletionen bei allen drei Patienten (M14400, M4716, M3625) in Bezug zur publizierten Sequenz des RB1-Gens (Gene Bank Accession Number L11910) genau bestimmen. Sowohl die 5'- als auch 3'-Bruchpunkte der drei Deletionen sind verschieden. Sie sind aber im Vergleich zur Ausdehnung der Deletionen auf sehr enge Bereiche beschränkt. Datenbank-gestützte Analysen zeigten, dass die proximalen Bruchpunkte alle in einem Bereich von 830 Basenpaaren in Intron 23 lokalisiert sind, der Teil eines 6017 Basenpaar langen, repetitiven L1HS Elements aus der Familie der LINE (Long Interspersed Nuclear Element) Sequenzen ist. Die distalen Bruchpunkte sind in einem Bereich von 235 Basenpaaren in Intron 24 lokalisiert, der Teil eines MER21B Elements von 764 bp Länge ist (s. Abb. 17 A).

A



B

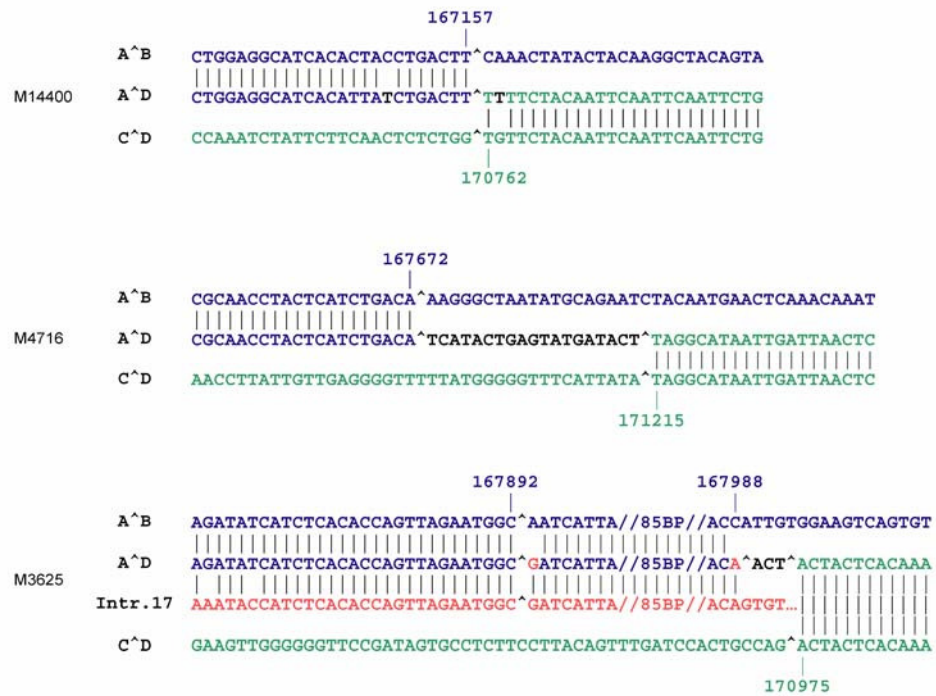


Abb. 17: A Genomische Organisation von Teilen des RB1-Gens und Lokalisation der repetitiven Elemente L1HS, L1PA5 und MER21B. Die Exons 17 und 21 bis 25 sind durch vertikale graue Balken gekennzeichnet. Die Sequenzähnlichkeiten zwischen L1HS und L1PA5 sind durch helles und dunkles Blau gekennzeichnet. Die 95 bp umfassende Region in Intron 17, die eine exakte Übereinstimmung mit der Sequenz am 5' Bruchpunkt von Patient M3625 aufweist, ist durch einen roten vertikalen Balken gekennzeichnet.

B Sequenz-Alignment der mutierten (A^D) und der Wildtypallele (A^B und C^D). Normale Sequenzen vom 5' Bruchpunkt (A^B) sind blau dargestellt, normale Sequenzen vom 3' Bruchpunkt (C^D) grün und Sequenzen von Intron 17 rot.

Die Sequenzanalyse der Deletionsbruchpunkte zeigte im Detail:

- bei Patient M14400 eine einfache Deletion (ohne zusätzliche Insertion) von 3605 Basenpaaren mit dem 5'-Bruchpunkt bei RBg167157 und 3'- bei RBg170762 (Gene Bank accession no. L11910) (s. Abb. 17 B)
- bei Patient M4716 eine Deletion von 3543 Basenpaaren in Verbindung mit einer Insertion von 19 Basenpaaren, deren Herkunft durch Sequenzvergleichsanalyse (BLASTN) nicht plausibel erklärt werden konnte. Der 5' Bruchpunkt ist bei RBg167672 und der 3'- bei RBg171215 lokalisiert (s. Abb. 17 B).
- bei Patient M3625 eine komplexe Mutation, die als Kombination einer Deletion von 2988 bp (del167988^170975) mit einer 3 Basenpaar-Insertion (ins167988insACT) beschrieben werden kann. Diese am möglichen Mechanismus orientierte Beschreibung erklärt jedoch nicht die Sequenzabweichungen zur Konsensussequenz an vier Positionen (RBg167893), (RBg167920), RBg(167937) und (RBg167988) innerhalb der 95 bp in 5' zum 5' Bruchpunkt der Mutation. Durch NCBI-Blast Datenbankabgleich gegen die gesamte Genomsequenz zeigten diese 95 Basenpaare eine 100% Sequenzübereinstimmung mit einer Region im Intron 17 des RB1-Gens (antisense Orientierung). Diese Region in Intron 17 ist Teil eines repetitiven L1PA5 Elements von 1333 bp Länge welches ein, allerdings unvollständiges, Mitglied der LINE Familie ist (s. Abb. 17 A).

3.3.4 Duplikationen von Teilen oder des ganzen RB1-Gens

In DNA aus Tumoren von zwei Patienten mit isoliert unilateralem Retinoblastom (M14070, M24003) fanden wir in der QMPX-PCR eine Verdreifachung der Gendosis aller Exons des RB1-Gens. Dieser Befund wurde durch Realtime-PCR Analysen bestätigt. Eine mögliche Interpretation dieses Befundes ist eine Trisomie 13 (oder des langen Arms dieses Chromosoms) wie sie bereits in anderen Retinoblastomen beobachtet wurde (Herzog et al., 2001). Eine funktionelle Inaktivierung des RB1-Gens wird durch eine solche Veränderung jedoch nicht begründet.

In DNA aus Tumorproben von zwei weiteren Patienten (M21850, M24504) mit isoliert unilateralem Retinoblastom identifizierten wir Duplikationen zusammenhängender Bereiche des RB1-Gens. Beide Duplikationen konnten in Blut-DNA der Patienten nicht nachgewiesen werden und sind daher in somatischen Zellen neu aufgetreten.

Das Muster der Gendosisveränderungen in DNA aus der Tumorprobe des isoliert einseitig betroffenen Patient M21950 zeigte sowohl Deletionen als auch Vermehrungen verschiedener,

nicht zusammenhängender Bereiche des RB1-Gens. Die Gendosisveränderungen konnten mittels Realtime-PCR bestätigt werden, eine einfache mechanistische Beschreibung der Ursache für dieses komplexe Mutationsmuster konnten wir jedoch nicht finden. Wir haben daher diese komplexe Mutation nicht in die Analyse der Bruchpunktverteilung einbezogen.

3.4 Genotyp-Phänotyp Korrelationen

3.4.1 Anteil der Patienten mit Nachweis konstitutioneller konstitutioneller *gross deletions*

Zur Bestimmung des Anteils von *gross deletions* an allen krankheitsursächlichen RB1-Genmutationen und zur Erkennung möglicher Zusammenhänge zwischen Genotyp und Phänotyp, haben wir in die diesbezüglichen Analysen auch die konstitutionellen Mutationen mit einbezogen, die in vorangegangenen Untersuchungen durch Southern-Blot-Hybridisierung oder durch zytogenetische Analysen im Institut für Humangenetik Essen nachgewiesen worden waren (Horsthemke et al., 1987; Kloss et al., 1991 und unveröffentlichte). Insgesamt sind *gross deletions* in peripherem Blut von 15 % (65/433) der Indexpatienten mit hereditärem/bilateralem Retinoblastom und von 6,5 % (17/262) der Patienten mit isoliertem unilateralem Retinoblastom identifiziert worden.

3.4.2 Phänotyp bei Patienten mit zytogenetisch erkennbaren und submikroskopischen Ganzgendeletionen

Bei 38 der 82 (46%) Patienten mit *gross deletions* betrafen die Deletionen das gesamte RB1-Gen. Die Ausdehnung dieser Deletionen war bei 27 (71%) Patienten so groß, dass sie auch in konventioneller zytogenetischer Analyse erkennbar waren (zytogenetisch nachweisbare Deletionen). Bei Patienten mit zytogenetisch nicht erkennbaren (submikroskopischen) Ganzgendeletionen (n=11) lag im Vergleich zu Patienten mit zytogenetisch nachweisbaren Deletionen (n=27) häufiger ein familiäres Retinoblastom vor (4/11 vs 2/27, p=0,0034 Fisher's exakter Test, zweiseitig, s. Abb. 18 A). Die Verteilung der Ausprägung des Phänotyps (bilaterales Retinoblastom, unilaterales Retinoblastom und kein Retinoblastom) war unter Trägern zytogenetischer und submikroskopischer Ganzgendeletionen annähernd gleich (s. Abb. 18 B).

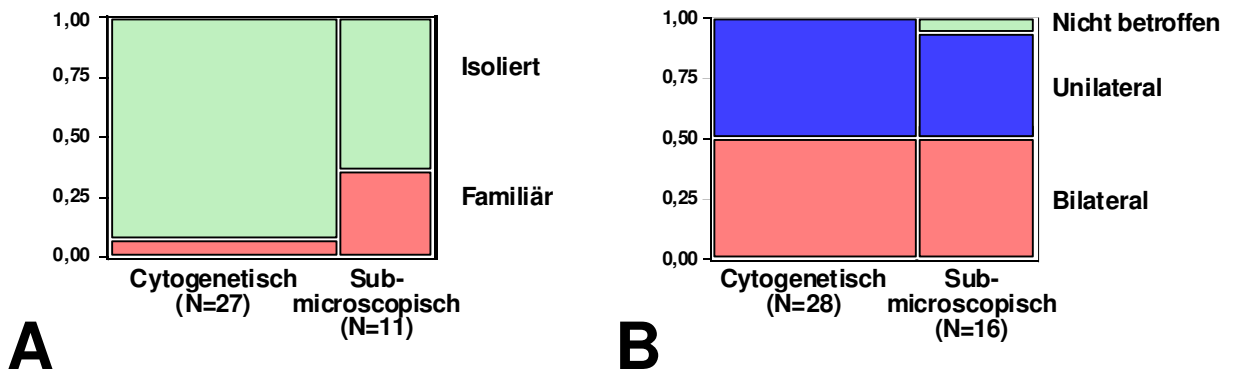


Abb. 18: **A** Graphische Darstellung der Anteile von Patienten mit isoliertem und familiärem Retinoblastom unter Patienten mit zytogenetisch erkennbaren und submikroskopischen Ganzgendetionen. **B** Zell-Plot der Verteilung der unterschiedlichen Phänotypen (nicht betroffene Träger, unilaterales Retinoblastom, bilaterales Retinoblastom) unter Patienten mit zytogenetischen und submikroskopischen Ganzgendetionen.

3.4.3 Phänotypanalyse bei Patienten mit *gross deletions* mit definierten Bruchpunkten im RB1 Gen

Um die Datenbasis für die Genotyp-Phänotyp-Assoziation zu erweitern, wurden für die folgenden Analysen auch bisher veröffentlichte konstitutionelle *gross deletions* mit definierten Bruchpunkten hinzugezogen (Dryja et al., 1989; Dryja et al., 1993; Hashimoto et al., 1991; Kloss et al., 1991; Kato et al., 1994; Bremner et al., 1997; Connolly et al., 1983; Zajacsek et al., 1999; Zajacsek et al., 1998; Richter et al., 2003; Houdayer et al., 2004). Insgesamt wurden für die Genotyp-Phänotyp-Korrelationen 186 Träger (Patienten mit Retinoblastom und Familienangehörige mit unvollständiger Penetranz) heterozygoter Deletionen im RB1-Gen mit klar definierten Bruchpunkten berücksichtigt.

Die Analyse zeigt, dass fast alle Träger von RB1-Deletionen mit nur einem Bruchpunkt innerhalb des Gens an beidseitigem Retinoblastom erkrankten (Abbildung 19). Demgegenüber zeigen Träger von Ganzgendetionen und von Deletionen mit beiden Bruchpunkten innerhalb des RB1-Gens eine signifikant mildere Ausprägung ($p < 0,006$ für Ganzgendetionen und $p < 0,001$ für intragene Deletionen, likelihood ratio test).

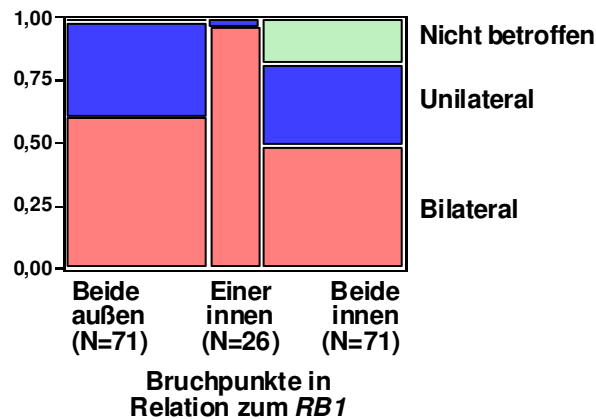


Abb. 19: Graphische Darstellung der Anteile von nichtbetroffenen Mutationsträgern und Patienten mit unilateralem und bilateralem Retinoblastom unter Trägern von Ganzgendeletionen (beide Bruchpunkte außerhalb des RB1), Deletionen mit einem Bruchpunkt im Gen und mit beiden Bruchpunkten im Gen.

Die A und B Pocket-Domänen des pRB Proteins sind von besonderer Bedeutung für die Zellzyklusregulation. Eine Auswertung der Genotyp-Phänotyp Relationen unter diesem Aspekt zeigt, dass Träger eines Deletionsallels mit intakten Pocket-Domänen eine mildere phänotypische Ausprägung zeigen als Träger von Deletionen, die diese Regionen mit erfassen ($p < 0,001$, likelihood ratio test, Abbildung 20 A).

Ein Teil der Deletionen mit beiden Bruchpunkten im RB1-Gen lassen den Leserahmen (Reading Frame) intakt (in-Frame Deletionen). Unsere Analyse zeigt, dass Träger solcher Mutationen eine mildere phänotypische Expression zeigen, als Träger von Deletionen, die den Leserahmen verschieben (frame-shift Mutationen) ($p < 0,001$, likelihood ratio test, Abbildung 20 B).

Die Analyse von Deletionen, welche Bereiche betreffen, die für die funktionellen Pocket-Domänen A/B kodieren, zeigt, dass Träger von in-Frame Deletionen außerhalb dieser Bereiche meist nur unilateral betroffen oder nicht an Retinoblastom erkrankt sind. Dagegen entwickeln die meisten Träger von frame-shift Deletionen in diesen Bereichen ein beidseitiges Retinoblastom ($p < 0,001$, likelihood ratio test, Abbildung 20 C).

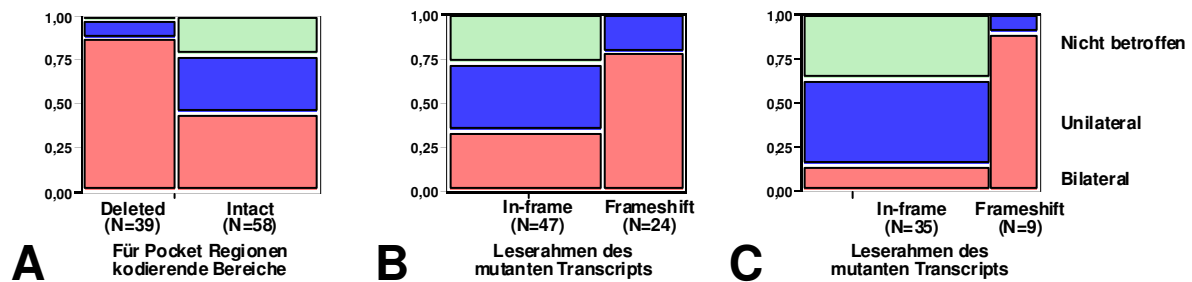


Abb. 20: Graphische Darstellung der Anteile von nichtbetroffenen Mutationsträgern und Patienten mit unilateralem und bilateralem Retinoblastom. **A** Vergleich der phänotypischen Ausprägungen bei Trägern von Mutationen, die die funktionellen Pocket Domänen intakt lassen, und solchen, bei denen die Pocket Domänen ganz oder teilweise betroffen sind. **B** Vergleich der phänotypischen Ausprägungen bei Mutationsträgern von in-Frame- und Frameshift-Mutationen. **C** Vergleich der Phänotypischen Ausprägungen bei Mutationsträgern von in-Frame- und Frameshift-Mutationen, die die funktionellen Pocket-Domänen intakt lassen.

3.4.4 Analyse der Verteilung der Bruchpunkte von gross deletions im RB1-Gen

Von den 82 im Rahmen dieser Arbeit identifizierten *gross deletions* hatten 44 zumindest einen Bruchpunkt im RB1-Gen. Durch Literaturrecherche und Abfrage der Human Gene Mutation Database konnten wir weitere 24 Mutationen mit wenigstens einem Bruchpunkt innerhalb des RB1-Gens ermitteln (www.hgmd.org, Richter et al., 2003; Houdayer et al., 2004; Zajacsek et al., 1999; Zajacsek et al., 1998; Ata-ur-Rasheed et al., 2002; Bremner et al., 1997; Dryja et al., 1989; Dryja et al., 1993; Kato et al., 1994). Um herauszufinden, ob das Auftreten von Deletionsbruchpunkten in den verschiedenen Introns des RB1-Gens gleich verteilt ist, haben wir die Zahl bekannter Deletionsbruchpunkte auf die Länge des jeweils betroffenen Introns bezogen. Abbildung 21 zeigt den Graph einer linearen Regression dieser Aufstellung unter Angabe des 95% Konfidenzintervalls (grüne Kurven). Es ist zu erkennen, dass die meisten Introns eine vergleichbare Rate an Bruchpunkten per Länge aufweisen. Ausnahmen sind die Introns 13, 16, 23 und 24 mit deutlich erhöhter Bruchpunkthäufigkeit (in rot hervorgehoben). In den Introns 5, 10, 15 und 26 wurden keine Bruchpunkte beobachtet (blaue Darstellung). Intron 15 ist mit einer Länge von 79 bp auf der logarithmischen X-Achse nicht darstellbar.

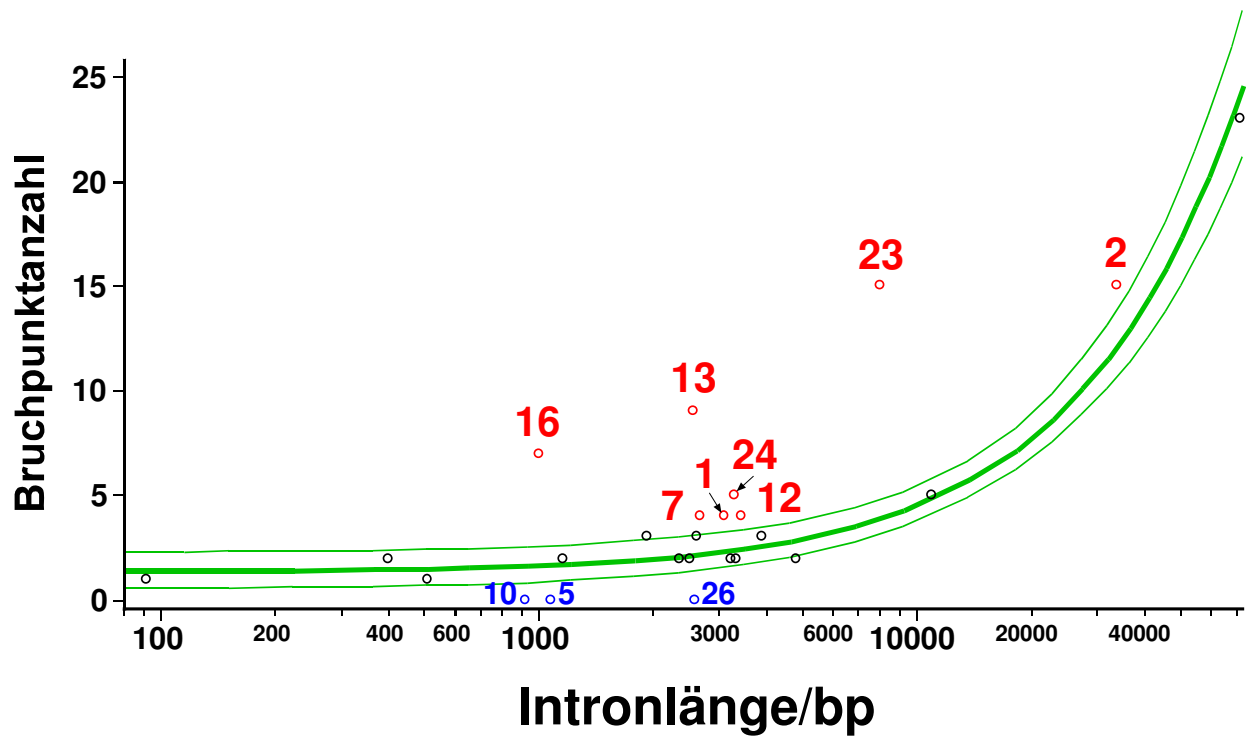


Abb. 21: Die Graphik zeigt die Anzahl der in den jeweiligen Introns beobachteten Bruchpunkte bezogen auf die Intronlänge (logarithmische Skala). Die grünen Kurven stellen das Ergebnis einer linearen Regression mit 95 % Konfidenzintervall dar.

4. DISKUSSION

Umfangreiche Deletionen (*gross deletions*) des RB1-Gens waren die ersten Mutationen, die bei Patienten mit Retinoblastom bestimmt wurden (Francke und Kung, 1976; Friend et al., 1986). Die Identifikation gelang durch zytogenetische Analysen und, nach Identifikation der Sequenz dieses Gens, durch Southernblot Hybridisierung mit intragenen Sonden. Jedoch nur ein kleiner Teil der Patienten mit Retinoblastom hat Deletionen, die so groß sind, dass sie durch zytogenetische Analysen darstellbar sind. Durch die Southernblot Hybridisierung können zwar auch kleinere Deletionen erkannt werden, aber die Methode ist in Bezug auf den Arbeitsaufwand und die Menge der erforderlichen DNA sehr aufwändig und hat sich daher nicht zur genetischen Analyse von Patienten mit Retinoblastom in der Routine etabliert. So ist es zu erklären, dass es auch 15 Jahre nach Identifikation des RB1-Gens nur wenig Daten zum Spektrum der Mutationen vom Typ *gross deletion* gab. Erst die 2003 von Richter et al. veröffentlichte Methode der quantitativen Multiplex-PCR (QMPX-PCR) vereinfachte die Identifikation von *gross deletions* und ermöglichte so die Untersuchung einer größeren Zahl von Proben. In der vorliegenden Arbeit benutzten wir die QMPX-PCR um *gross deletions* in Proben zu bestimmen, die am Institut für Humangenetik zuvor ohne Erfolg mit anderen Methoden auf Mutationen hin untersucht worden waren. Insgesamt konnten in der vorliegenden Arbeit bei 64 Patienten *gross deletions* identifiziert werden.

4.1 RB1-Mutationsspektrum bei Patienten mit Retinoblastom und Genotyp-Phänotyp-Beziehungen (Albrecht et al., 2005)

Aufgrund der Größe des unseren Analysen zugrunde liegenden Patientenkollektives erlauben unsere Daten in Verbindung mit den zuvor mit anderen Methoden in Essen identifizierten Mutationen (Horsthemke et al., 1987; Kloss et al., 1991) eine sehr gute Abschätzung des Anteils von *gross deletions* am Mutationsspektrum des RB1-Gens: *gross deletions* waren in konstitutioneller DNA von 65/443 (15%) nicht verwandten Patienten mit bilateralem oder familiärem Retinoblastom und 17/262 (6,1%) Patienten mit isoliertem unilateralem Retinoblastom nachweisbar. Bezüglich der Mutationen bei Patienten mit bilateralem oder familiärem Retinoblastom bestätigen unsere Daten die Ergebnisse von Richter et al., 2003 – *gross deletions* bei 29 von 224 Patienten (13%) – und Houdayer et al., 2004 mit einem Anteil von 17/102 Patienten (17%). Die Frequenz von *gross deletions* in konstitutioneller DNA von Patienten mit isoliertem unilateralem Retinoblastom ist in unserem Patientenkollektiv jedoch deutlich höher (8,3%) als in den Arbeiten von Richter oder Houdayer (4/134, 3%, bzw. 1/90,

1,1%). Eine mögliche Ursache für diese Abweichung könnte der höhere Anteil von Patienten mit 13q-Syndrom in unserem humangenetisch erfassten Patientenkollektiv sein.

Von den 82 konstitutionellen *gross deletions* in unserem Patientenkollektiv waren 27 (33%) auch durch konventionelle zytogenetische Analysen detektierbar (zytogenetische Deletionen des RB1 in der Bande 13q14). Wir haben nicht von allen diesen Patienten die Informationen, welche zur klinischen Diagnose eines 13q-Deletionssyndroms erforderlich sind. Es fällt jedoch auf, dass unter den Patienten mit zytogenetisch erkennbaren Deletionen der Anteil familiärer Fälle mit 2/27 (7,4%) auffällig niedrig ist. Dies spricht dafür, dass Träger einer solchen Mutation im Vergleich zu anderen Patienten mit erblichem Retinoblastom weniger Nachkommen haben. Das ist nachzuvollziehen, da Patienten mit 13q- Syndrom oft Fehlbildungen und eine mentale Retardierung aufweisen.

Nach der Knudson'schen Zweischrithypothese ist die Ausprägung des Phänotyps bei Trägern einer Keimbahnmutation (Mutation in konstitutioneller DNA nachweisbar) das Ergebnis einer Zufallsverteilung, nämlich dem zufälligen Auftreten einer zweiten somatischen Mutation. Analysen der Genotyp-Phänotyp-Beziehungen bei Patienten mit Punktmutationen haben jedoch gezeigt, dass die phänotypische Ausprägung von der Art und Lokalisation der Mutation mitbestimmt wird (Zusammenfassung siehe Lohmann und Gallie, 2004). In der vorliegenden Arbeit haben wir Genotyp-Phänotyp-Beziehungen auch bei Patienten mit *gross deletions* untersucht. Bei Trägern einer konstitutionellen Deletion 13q bestätigen unsere Ergebnisse die bereits von Matsunaga, 1980, erstmalig veröffentlichte Beobachtung eines erhöhten Anteils von Patienten mit unilateralem Retinoblastom. Zur Erklärung postulierten Bunin et al., 1989, dass die geringere Tumorzahl bei Patienten mit Deletion 13q durch das reduzierte Spektrum effektiver Zweitmutationen zu erklären sei: Bei über 60% aller Retinoblastome liegen chromosomale Mechanismen wie interchromosomale Rekombination oder Nondisjunction dem Verlust des zweiten RB1-Allels zugrunde (Cavenee et al., 1983; Hagstrom und Dryja, 1999; Zhu et al., 1992) und solche Mutationen würden bei Trägern einer Deletion 13q zum homozygoten Verlust aller im Bereich der Region lokalisierten Gene führen. Sollten hierbei für das Überleben der Zelle essentielle Gene betroffen werden, so ist nicht mit der Entstehung eines Tumors sondern mit dem Tod der Zelle zu rechnen. Daher ist eine um 60% reduzierte Zahl an Tumoren zu erwarten; tatsächlich ist dies mit den beobachteten Tumorzahlen gut vereinbar (Lohmann et al., 1994).

Als wesentlich neuen Befund konnten wir hier feststellen, dass eine mildere phänotypische Ausprägung nicht nur bei zytogenetisch detektierbaren RB1-Deletionen sondern auch bei

submikroskopischen Ganzgendeletionen zu beobachten ist. Dies lässt vermuten, dass die nach o.g. Hypothese von Bunin et al., 1989, vermuteten Gene, deren homozygote Deletion zum Zelltod führt, in unmittelbarer Nähe des RB1-Gens lokalisiert sein müssen. Unsere Daten zeigen jedoch auch, dass fast alle Träger einer Deletion mit nur einem Bruchpunkt im RB1-Gen bilateral betroffen sind (25 von 26 Trägern, inklusive publizierte Fälle). Dies zeigt, dass Mutationen die nur das 5'- oder 3'-Ende des RB1-Gens deletieren nicht mit einer milden phänotypischen Ausprägung assoziiert sind. Im Sinne der o.g. Hypothese ist zu vermuten, dass die für das Überleben der Zellen nötigen Gene auf beiden Seiten des RB1-Gens lokalisiert sein müssen und nur die homozygote Deletion beider angrenzenden Bereiche (in 5' und in 3' Richtung vom RB1) zum Zelltod führt.

Deletionen mit nur einem Bruchpunkt innerhalb des RB1-Gens zeigen eine phänotypische Ausprägung, die der von Frameshift- oder Nonsense-Mutationen entspricht (Lohmann et al., 1996). Im Vergleich dazu haben Träger von *gross deletions* mit beiden Bruchpunkten innerhalb des Gens einen signifikant milderen Phänotyp (Abb. 19). Eine weitergehende Analyse der intragenen *gross deletions* nach betroffenen Regionen und nach der anzunehmenden Konsequenz auf Translationsebene zeigt, dass nur Deletionen, die nicht die funktionellen Pocket-Domänen betreffen (Abb. 20 A) oder nicht zu einem vorzeitigen Stopp-Kodon führen (Abb. 20 B), mit geringerer Tumor-Zahl und unvollständiger Penetranz assoziiert sind. Die mildeste Krankheitsausprägung haben Träger von Mutationen, für die beides zutrifft: *Gross deletions* mit in-frame Verlust und mit intakten A/B-Pocket-Domänen zeigen eine hohe Rate unvollständiger Penetranz (13/35, 37% gesunde Träger). Betroffene Träger sind meist nur unilateral erkrankt (17/35, 49%) (Abb 20 C). Für Punktmutationen wurden ähnliche Zusammenhänge zwischen Lokalisation der Mutation, Leserahmenerhalt und phänotypischer Ausprägung beschrieben (Lohmann und Gallie, 2004). Das zeigt, dass die Lokalisation und die Konsequenz einer Mutation für die Translation (Leserahmen) eine größere Rolle für die phänotypische Ausprägung haben als die Größe der Mutation. Eine weitere Ähnlichkeit zu den bei Punktmutationen festgestellten Genotyp-Phänotypbeziehungen ist, dass weder in unserem Patientenkollektiv noch bei den zuvor publizierten *gross deletions* isoliert nur die Exons 26 und/oder 27 betroffen waren. Dies spricht dafür, dass, wie bereits bei Punktmutationen festgestellt, isolierte Deletionen dieser Regionen nicht zu einem gezielten Abbau der mRNA (Nonsense-Mediated-Decay) führen und dass die resultierenden N-terminal trunkierten pRBs tumorsuppressive Aktivität aufweisen (Lohmann et al., 1996).

4.2 Mechanismen der Entstehung von Rekurrenten Einzelexon-Deletionen (Albrecht et al., 2004)

Unter den 85 von uns identifizierten *gross deletions* waren nur 5 Deletionen einzelner Exons (6,1%). Unter diesen betrafen drei isoliert das Exon 24. Diese waren auch die einzigen rekurrenten Einzelexon-Deletionen bei den von uns untersuchten Patienten. Deletionen einzelner Exons sind selten: Es wurden zuvor nur fünf weitere rekurrente Einzelexon-Deletionen im RB1-Gen veröffentlicht: Richter et al., 2003, identifizierten bei drei von 211 Patienten Einzelexon-Deletionen von Exon 17 und bei zwei Patienten von Exon 13. In Bezug auf die Exon 17 Deletion ist darauf hinzuweisen, dass das Intron 17 sehr groß ist (71,7 kb) und die Ausdehnung von Deletionen des Exons 17 daher sehr verschieden sein kann.

Die genaue Lokalisation der Deletionsbruchpunkte ist bei den meisten publizierten *gross deletions* nicht bekannt, da diese Information einerseits von geringer Relevanz für die klinische Genetik ist und andererseits nur mit aufwändigen Methoden gewonnen werden kann. Im Fall der hier identifizierten rekurrenten Exon 24 Deletionen war die Bestimmung der Deletionsbruchpunkte jedoch von besonderem Interesse, da Erkenntnisse über den Entstehungsmechanismus dieser Deletionen zu erwarten waren. Die Mehrzahl der bislang in verschiedenen Genen auf Sequenzebene genau charakterisierten *gross deletions* zeigen im Bereich der Bruchpunkte Sequenzabschnitte mit direkter oder indirekter Ähnlichkeit (Chuzhanova et al., 2003). Die Analyse der Bruchpunktsequenzen bei allen drei Patienten mit Exon 24 Deletion zeigte jedoch dabei keine Sequenzähnlichkeiten zwischen den 5'- und 3'-Bruchpunktbereichen. Dennoch ist auffällig, dass sowohl die 5'- als auch die 3'-Bruchpunkte sehr nah beieinander liegen (Bruchpunktcluster). Dies spricht sehr für einen gemeinsamen Mutationsmechanismus. Die Bruchpunktcluster liegen in einem L1HS Element (5'-Bruchpunkte) bzw. in einem MER21B Element (3'-Bruchpunkte). Sowohl L1- als auch MER-Elemente sind transposable Elemente. Während L1 Elemente Retrotransposons sind (Kazazian und Goodier, 2002) gehören MER Elemente zu den DNA-Transposons (International Human Genome Sequencing Consortium 2001). DNA-Transposons haben praktisch immer ihre Transpositionsaktivität verloren und sind daher nur noch „Transposon-Fossilien“ (Lander et al., 2001). L1 Elemente gehören zu den Long Interspersed Nuclear Elements (LINEs) und machen circa 17% der Sequenz des humanen Genoms aus. Ungefähr 5000 L1 Elemente im Genom haben volle Länge (6 kb) und von diesen besitzen 60 bis 100 noch Retrotranspositionsaktivität (Kazazian und Goodier, 2002). Es wurde beschrieben, dass *gross deletions* durch Insertionen von L1 Elementen im Rahmen von Retrotranspositions-Ereignissen verursacht werden können (Gilbert et al., 2002). Des Weiteren sind L1 Elemente

selbst oft Ziele von Retrotransposon-Insertionen (Symer et al., 2002). Bei den von uns identifizierten Exon-24 Deletionen ist jedoch keine Insertion mit klarer Herkunft aus einem aktiven L1 Element erkennbar. Das L1HS Element in Intron 23 des RB1-Gens hat die volle Länge eines kompletten L1 Elements (6 kb). Es besitzt zwar eine hohe Sequenzähnlichkeit (97%) zu typischen aktiven transpositionsfähigen L1 Elementen (L1.3, Gene Bank accession no. L19092), nicht jedoch die beiden, für eine Retrotranskription notwendigen offenen Leserahmen (ORF1 für RNA-Bindungsprotein und ORF2 für Endonuclease und Retrotranskriptase (Kazazian und Goodier, 2002). Da sowohl das RNA-Bindungsprotein (ORF1) als auch die Endonuclease/Retrotranskriptase für eine eigene Retrotranskriptionsaktivität notwendig sind, ist der L1HS in Intron 23 des RB1-Gens kein aktives LINE und ein Zusammenhang zwischen Auftreten der Deletionen und Retrotransposition des L1HS ist unwahrscheinlich.

In den letzten Jahren sind alternative Mechanismen der Entstehung von *gross deletions* identifiziert worden. Diese stehen in Zusammenhang mit der Chromatinstruktur. Im Zellkern von Säugetier-Zellen ist das Chromatin in circa 60 000 Schleifen aufgeteilt. Diese Schleifen sind in regelmäßigen Abständen an eine zelluläre Struktur, die nucleäre Matrix oder Scaffold (Gerüst), gebunden. Auf der Seite der DNA wird die Bindung über die S/MARs (Scaffold/Matrix Attached Region) vermittelt (Bode et al., 2000). Dabei handelt es sich um Sequenzbereiche von mindestens 300 bp die keine erkennbare Konsensus Sequenz aufweisen (Benham et al., 1997, Bode et al., 2000). S/MARs sind insgesamt AT-reich. Die Aktivität der S/MAR wird jedoch nicht durch den AT-Gehalt des Elements sondern durch die Verteilung in abgegrenzten besonders AT-reichen Bereichen bestimmt (Bode et al., 2003). Diese Verteilung beeinflusst die Neigung zur Auflösung der Basenpaarung (unwinding) des DNA Doppelstrangs im Bereich der S/MARs (Bode et al., 1992; Benham et al., 1997). Aufgrund des unwinding-Potentials werden S/MARs als rekombinante Strukturen angesehen (Bode et al., 2000) und stellen bevorzugte Integrationsstellen für aktive Retroelemente dar (Goetze et al., 2003). Umgekehrt zeigt die Integration von Retroelementen die Präsenz von S/MARs an (Bode et al., 2000).

Neuere Untersuchungen haben nun gezeigt, dass genomische Fragilität vor allem am Rand von S/MARs entsteht, so zum Beispiel in der Übergangszone zwischen B-Typ DNA und *single strand*-DNA. Solche Übergangszonen sind durch erhöhte Zugänglichkeit für DNase gekennzeichnet (Bode et al., 2000, Goetze et al., 2003), während die Matrix-bindende Sequenz selbst, vermutlich durch Proteine mit *single strand*-DNA Bindepotential, weitestgehend vor Rekombination geschützt ist. In den letzten Jahren wurden verschiedene

Software-Programme zur Identifikation von S/MARs entwickelt. Eines der ersten Programme, der „MAR-finder“ (heute MARwiz, www.futuresoft.org/MarFinder), basiert auf der statistischen Detektion von für Replikationsursprünge typischen S/MAR Motiven, wie TG-reiche Motive, curved oder kinked DNA (DNA Schleifen), Topoisomerase II Consensus und AT-reiche Sequenzen. Eine neuere Strategie, der „Stress Induced Duplex Destabilization“ Ansatz (SIDD), bedient sich einer mechanisch-statistischen Methode um Regionen von DNA mit Neigung zur Auflösung der Basenpaarung (Base Unpairing Region, BUR) zu identifizieren, an denen die Bindung an die nucleäre Matrix stattfindet (Benham et al., 1997; Goetze et al., 2003). In vielen Fällen stimmen die Ergebnisse beider Strategien überein (Goetze et al., 2003).

Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse der Analysen der Region um Exon 24 mit beiden Methoden. Die Bruchpunktlokalisationen der Deletionen aller drei Patienten mit Deletion des Exons 24 fallen in Bereiche mit minimalem MAR-Potential in der MarFinder Analyse. Im SIDD-Profil zeigt die Region zwischen den Bruchpunktclustern (Position 1100 bp bis 3500 bp in der Grafik) eine Abfolge von destabilisierten Regionen, die in der Analyse eine standardisierte superhelicale Dichte von $-0,055$ kcal/mol aufweisen. Dies ist typisch für starke S/MAR Elemente, da ein solcher Aufbau die Bindung von prototypischen Matrix-Proteinen wie Laminen und dem Scaffold Attachment Factor A (SAF-A) ermöglicht (Bode et al., 2000; Bode et al., 2003). Auf beiden Seiten dieser, durch die S/MAR gebildeten Base Unpairing Region (BUR), befinden sich die DNA-Segmente mit einer Stabilität von 8-10 kcal/mol und somit ohne S/MAR Potential. In diesen Segmenten sind die Bruchpunkte der drei Patienten lokalisiert. Unsere Analysen zeigen, dass die flankierenden Regionen der S/MARs um Exon 24 im RB1-Gen bevorzugte Lokalisationen für Deletionseignisse darstellen. Dies unterstützt die durch die Analyse anderer Gene entwickelten Konzepte der Entstehung von Deletionen (Vanin et al., 1983; Bode et al., 2000).

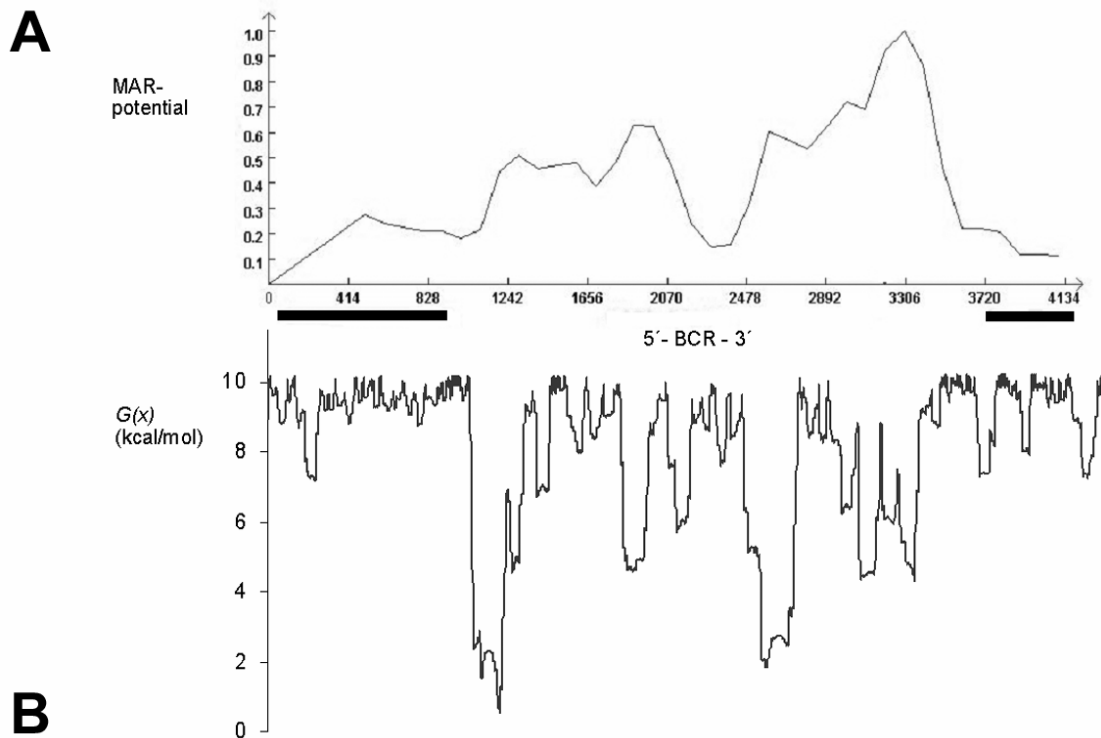


Abb 22: Mar-Potential der die Bruchpunkte der drei Exon 24 Deletionen enthaltenden Region (Breakpoint Cluster Regionen, BCR, gekennzeichnet durch die schwarzen horizontalen Balken). **A** Ergebnis der Analyse durch die MAR-Finder Software (MARwiz). **B** Ergebnis der Analyse durch „Stress induced duplex Destabilization“ (SIDD). Ein S/MAR ist eine „Base Unpairing Region“ (BUR), die durch dicht aneinander gelegene destabilisierte Regionen, so genannte Unpairing-Elemente, gekennzeichnet ist. Die Flanken solcher S/MARs sind bevorzugte Ziele von Deletionen, Translokationen und von Transposon-Integration, wie im Text beschrieben. Solche Alterationen treten äußerst selten im Zentrum von S/MARs, oder in größeren Regionen mit geringem S/MAR-Potential auf.

4.3 Verteilung und mögliche Entstehungsmechanismen der Bruchpunkte von *gross deletions* im RB1-Gen

Unsere Analyse der Verteilung von *gross deletions* mit intragenen Bruchpunkten zeigt in weiten Bereichen des Gens eine gleichmäßige Dichte des Auftretens von Bruchpunkten. Einzelne Intronbereiche des RB1-Gens – Intron 23, 16, 13 und Intron 24 – zeigen jedoch eine erhöhte Bruchpunkthäufigkeit per Intronlänge (siehe Abb. 21). Für die Introns 23 und 24 kann diese Bruchpunkthäufung durch die S/MAR um Exon 24 erklärt werden (siehe oben). Eine MARwiz-Analyse auf S/MARs in den Introns 16 und 13 zeigte ebenfalls ein erhöhtes MAR-Potential (s. Abb. 23).

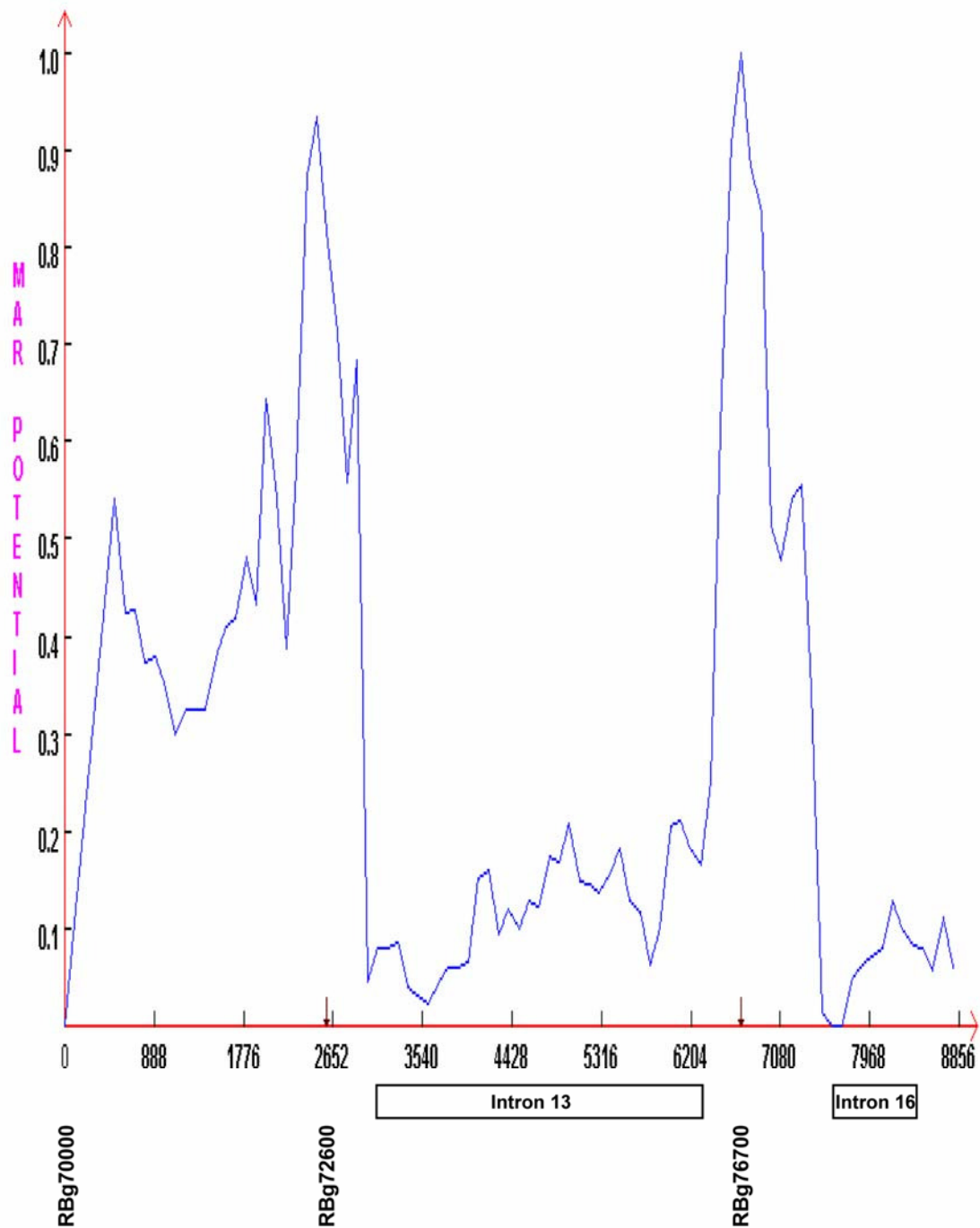


Abb. 23: Die Abbildung zeigt das mittels MAR-Finder ermittelte S/MAR-Potential der Region zwischen RBg70000 und RBg80000 (L11910). Die Lokalisationen der Introns 13 und 16 sind gekennzeichnet. Es lässt sich gut erkennen, dass sich beide Introns direkt an der Flanke starker S/MARs befinden, was die beobachtete Bruchpunkthäufung (Breakpoint-Cluster-Region, BCR) auch in diesen Introns erklären könnte.

Dies könnte eine Ursache für die Bruchpunkthäufung in diesen Bereichen sein. Eine Bestätigung der Präsenz von Matrix-bindenden Regionen in diesen Introns erfordert jedoch eine SIDD-Analyse (Stress Induced Duplex Destabilization).

Es ist wichtig zu betonen, dass ohne genaue Charakterisierung der Deletionsbruchpunkte über den Entstehungsmechanismus der einzelnen *gross deletion* nur Vermutungen möglich sind. So lassen sich z.B. Analysen von Sequenzähnlichkeiten zwischen den 5'- und 3'-Bruchpunktenden nur nach genauer Bruchpunktlokalisation durchführen (z.B. Komplexitätsanalyse Chuzhanova et al., 2003). Eine solche genaue Lokalisation von Deletionsbruchpunkten, wie in dieser Arbeit für Exon 24 beschrieben, ist jedoch sehr aufwändig und für Deletionen größerer Bereiche, die sich nicht mit einer Longrange-PCR überspannen lassen, mit vertretbarem Aufwand zur Zeit nicht möglich.

Durch Betrachtung vieler *gross deletions* konnten wir jedoch die oben genannten Regionen mit erhöhter Bruchpunktfrequenz (Breakpoint Cluster Regions, BCR) identifizieren und, auch ohne Kenntnis des genauen Entstehungsmechanismus jeder einzelnen Deletion, das Vorhandensein von angrenzenden S/MARs als mögliche Erklärung für die BCRs nahe legen. Diese Herangehensweise der Identifikation von BCRs und der ihnen möglicherweise zugrunde liegenden Besonderheiten der lokalen DNA-Sequenz, lässt sich auch auf andere Gene mit krankheitsverursachenden Deletionen anwenden. Sie könnte so einen wertvollen Beitrag zur Aufklärung der generellen Entstehungsmechanismen von deletionsassoziierten genetischen Erkrankungen liefern.

4.4 Nutzen für die Patienten durch effizientere Analysestrategie

Molekulargenetische Untersuchungen sind mittlerweile ein wichtiges Element bei der Betreuung von Retinoblastompatienten und ihren Familienangehörigen. Den betroffenen Familien können nach molekulargenetischem Ausschluss einer Mutation aufwändige und belastende klinische Augenuntersuchungen erspart werden. Dabei ist es wichtig, dass das Analyseergebnis möglichst zeitnah vorliegt. In Anbetracht des heterogenen Mutationspektrums des RB1-Gens ist dies nur durch eine effiziente Analysestrategie zu erreichen, bei der die hier etablierte QMPX-PCR am Anfang der Analysen steht. Die QMPX-PCR-Untersuchung hat primär quantitative Daten als Ergebnis (im Gegensatz z.B. zur Sequenzierung, die primär qualitative Daten – die Basensequenz – ausgibt). Je Patient fallen mehr als 25 Werte an (Signalintegrale der einzelnen Exons und Kontrollen). Aufgrund der experimentellen Variation ist zu erwarten, dass bei einem Teil der Patienten Werte für einzelne Exons außerhalb des Normalbereichs liegen. Diese Patienten wären daher nicht mehr der Gruppe ohne Deletionen zuzuordnen. Eine Anpassung des Schwellenwertes ist hierbei nicht zielführend, denn bei hoch gewähltem Schwellenwert zur Unterscheidung der beiden Gruppen erhält man zu viele falsch negative Bestimmungen, bei zu niedriger Schwelle zu

viele falsch positive Ergebnisse. Es ist daher festzustellen, dass mit der quantitativen Multiplex-PCR ohne Validierung mit einem unabhängigen Test nicht mit hinreichender Sicherheit heterozygote Einzlexon-Deletionen oder Insertionen festgestellt werden können. Da die Methode jedoch, wenn man den Schwellenwert entsprechend legt, eine hohe Sensitivität aufweist und sich schnell und kostengünstig durchführen lässt, kann sie gut als Screeningmethode in einem Untersuchungsablauf eingesetzt werden, der eine Bestätigung von Einzlexon-Veränderungen durch andere Verfahren vorsieht. Im Rahmen der Arbeit stellte sich die Realtime-PCR an genomischer DNA als besonders gut geeignete Methode zur Bestätigung der Screeningergebnisse heraus. Exonische Deletionen und Insertionen von beliebiger Lokalisation und Länge lassen sich durch dieses Verfahren mit hoher Präzision detektieren. Als alleiniges Untersuchungsverfahren auf Deletionen oder Insertionen für alle 27 Exons des RB1-Gens (ohne vorangehende Screeningmethode) eignet sich die Realtime-PCR jedoch nicht, da sie sehr aufwändig und kostenintensiv ist.

Deletionen oder Insertionen einzelner Exons können unter Umständen auch mittels Longrange-PCR nachgewiesen werden. Dieses Verfahren stellt eine kostengünstigere Alternative zur Realtime-PCR dar, ist jedoch in der Durchführung aufwändiger und birgt einige Probleme. So lassen sich durch Longrange-PCR nur Deletionen oder Insertionen von Exons, die nicht randständig zu großen Introns lokalisiert sind, sicher detektieren (weil beide Primer in nicht deletierten Bereichen liegen müssen, um ein Deletionsfragment nachweisen zu können). Des Weiteren kann durch Longrange-PCR nur mit mäßiger Sicherheit eine Deletion oder Insertion ausgeschlossen werden, da erstens kleine Deletionen oder Insertionen von wenigen hundert Basenpaaren Länge bei einem PCR-Fragment von mehreren Kilobasen kaum auf einem Gel zu differenzieren sind, und zweitens, im Fall von Insertionen, hauptsächlich das kürzere (Wildtyp-) Allel amplifiziert wird. Präferentielle Amplifikation von kürzeren Fragmenten erschwert auch die Bestimmung des Genotyps bei Proben mit heterozygoten Deletionen. Hier wird das längere Fragment des Wildtyp-Allels schlechter oder gar nicht amplifiziert. Dazu haben wir im Fall von Exon 24 Deletionen eine Longrange-PCR mit drei Primern zur besseren Amplifikation des Wildtyp-Allels entwickelt (siehe oben). Für die Longrange-PCR spricht jedoch, dass eine so detektierte Deletion oder Insertion als sicher vorliegend angesehen werden kann, und das PCR-Produkt zudem als Template für eine Sequenzierungsreaktion zur genauen Bruchpunktbestimmung genutzt werden kann (siehe Exon 24-Deletionen oben).

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass die quantitative Multiplex-PCR ein geeignetes Screeningverfahren zur Identifikation von Längenmutationen im RB1-Gen ist.

Eine Ergänzung durch Sequenzierung, genomische Realtime-PCR und eventuell Longrange-PCR muss jedoch zur Verifizierung der Ergebnisse durchgeführt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die molekulargenetische Analyse insbesondere bei Familien mit unvollständiger Penetranz von großem Nutzen für die Betroffenen ist (Noorani et al., 1996)

Unsere Genotyp-Phänotyp Analysen haben ergeben, dass *gross deletions* oft mit unvollständiger Penetranz assoziiert sind. Daher ist die Anwendung der hier vorgestellten Strategie zur Identifikation solcher Mutationen auch von besonderer Bedeutung für die molekulargenetische Analyse bei Patienten mit Retinoblastom.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Mutationen des RB1-Gens sind ursächlich für die Entstehung des Retinoblastoms. Die Bestimmung der krankheitsursächlichen Veränderung ist bei jedem Patienten für die optimale Betreuung seiner Familie erforderlich. Um Mutationen vom Typ *gross deletion* effizient zu erkennen, wurde in der vorliegenden Arbeit die quantitative Multiplex-PCR etabliert und mit hier neu entwickelten Methoden zur Bestätigung kombiniert. Die genomische Realtime-PCR und die Longrange-PCR bewährten sich hierbei als geeignete Verfahren.

Wir konnten mittels quantitativer Multiplex-PCR bei 61 Patienten *gross deletions* im RB1-Gen identifizieren (33 konstitutionelle Mutationen und 28 Mutationen in Tumormaterial). Somit konnten wir die Anzahl der publizierten Mutationen dieser Art annähernd verdoppeln.

In unserem Patientenkollektiv haben *gross deletions* einen Anteil von 15% von 443 der konstitutionellen Mutationen bei Patienten mit bilateralem oder familiärem Retinoblastom. Bei isoliert unilateral Betroffenen sind konstitutionelle *gross deletions* bei 6,1% von 262 festzustellen.

Durch die Analyse der Genotyp-Phänotyp-Beziehungen (mit Einschluss von zuvor publizierten Mutationen) konnte hier gezeigt werden, dass *gross deletions*, die zu vorzeitigen Stopp Kodons führen, die A/B Pocket-Domänen betreffen oder nur einen der Bruchpunkte innerhalb des Gens haben, zu einem schwereren Krankheitsbild führen (größere Zahl von Tumoren) als Ganzgendeletionen oder in-Frame Deletionen ohne Beteiligung der A/B Pocket-Domänen. Eine mögliche Ursache für die mildere phänotypische Ausprägung bei Patienten mit konstitutionellen Ganzgendeletionen – im Vergleich zu Deletionen mit einem Bruchpunkt im RB1-Gen – könnte die Beteiligung von Genen in direkter Nähe zum RB1 sein: Die homozygote Deletion von benachbarten Genen in 5'- und in 3'-Richtung des RB1-Gens könnte zum Zelltod führen und so das Entstehen eines Tumors unterbinden.

Die Analyse der Bruchpunktlokalisationen der von uns identifizierten und der zuvor veröffentlichten Mutationen zeigte vier Deletions-Bruchpunkt-Cluster im RB1-Gen: Intron 23, 24, 13 und 16. Durch Sequenzanalysen konnten wir zeigen, dass vermutlich Scaffold/Matrix Attached Regions (S/MARs) in Bezug auf die Ursache dieser Bruchpunkthäufungen eine Rolle spielen.

Die Integration der hier entwickelten Methodik in die Routine der molekulargenetischen Analyse bei Retinoblastom führt nicht nur zu einer höheren Mutations-Finderate sondern auch zu einer Verkürzung der molekulargenetischen Befunderhebung. Daher bleiben Angehörigen mit Risikoausschluss belastende Untersuchungen früher erspart.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Suckling, R. D., Fitzgerald, P. H., Stewart, J., and Wells, E. (1982): The incidence and epidemiology of retinoblastoma in New Zealand: A 30-year survey. *Br J Cancer*, 46, 729-736.
2. Draper, G. J., Sanders, B. M., Brownbill, P. A., and Hawkins, M. M. (1992): Patterns of risk of hereditary retinoblastoma and applications to genetic counselling. *Br J Cancer*, 66, 211-219.
3. Vogel, F. (1954): [Genetics and mutation rate of retinoblastoma (glioma retinae), with general remarks on methods of determining mutation rate in humans.]. *Z Mensch Vererb Konstitutionsl*, 32, 308-336.
4. Bornfeld, N., Schüller, A., Bechrakis, N., Henze, G., and Havers, W. (1997): Preliminary results of primary chemotherapy in retinoblastoma. *Klin Padiatr*, 209, 216-221.
5. Gallie, B. L., Budning, A., DeBoer, G., Thiessen, J. J., Koren, G., Verjee, Z., Ling, V., and Chan, H. S. (1996): Chemotherapy with focal therapy can cure intraocular retinoblastoma without radiotherapy. *Arch Ophthalmol*, 114, 1321-1328.
6. Schvartzman, E., Chantada, G., Fandino, A., de Davila, M. T., Raslawski, E., and Manzitti, J. (1996): Results of a stage-based protocol for the treatment of retinoblastoma. *J Clin Oncol*, 14, 1532-1536.
7. Abramson, D. H. and Servodidio, C. A. (1992): Retinoblastoma in the first year of life. *Ophthalmic Paediatr Genet*, 13, 191-203.
8. Abramson, D. H., Gamell, L. S., Ellsworth, R. M., Kruger, E. F., Servodidio, C. A., Turner, L., and Sussman, D. (1994): Unilateral retinoblastoma: new intraocular tumours after treatment. *Br J Ophthalmol*, 78, 698-701.
9. Eng, C., Li, F. P., Abramson, D. H., Ellsworth, R. M., Wong, F. L., Goldman, M. B., Seddon, J., Tarbell, N., and Boice, J. D., Jr. (1993): Mortality from second tumors among long-term survivors of retinoblastoma. *J Natl Cancer Inst*, 85, 1121-1128.
10. Abramson, D. H., Ellsworth, R. M., Kitchin, F. D., and Tung, G. (1984): Second nonocular tumors in retinoblastoma survivors. Are they radiation-induced? *Ophthalmology*, 91, 1351-1355.
11. Briard-Guillemot, M. L., Bonaiti-Pellie, C., Feingold, J., and Frezal, J. (1974): [Genetic study of retinoblastoma (author's transl)]. *Humangenetik*, 24, 271-284.
12. Vogel, F. (1979): Genetics of retinoblastoma. *Hum Genet*, 52, 1-54.
13. Horsthemke, B., Greger, V., Barnert, H. J., Hopping, W., and Passarge, E. (1987): Detection of submicroscopic deletions and a DNA polymorphism at the retinoblastoma locus. *Hum Genet*, 76, 257-261.
14. Lee, W. H., Bookstein, R., Wheatley, W., Benedict, W. F., and Lee, E. Y. (1987): A null allele of esterase D is a marker for genetic events in retinoblastoma formation. *Hum Genet*, 76, 33-36.
15. Fung, Y. K., Murphree, A. L., T'Ang, A., Qian, J., Hinrichs, S. H., and Benedict, W. F. (1987): Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. *Science*, 236, 1657-1661.
16. Dunn, J. M., Phillips, R. A., Zhu, X., Becker, A., and Gallie, B. L. (1989): Mutations in the RB1 gene and their effects on transcription. *Mol Cell Biol*, 9, 4596-4604.
17. Yandell, D. W., Campbell, T. A., Dayton, S. H., Petersen, R., Walton, D., Little, J. B., McConkie-Rosell, A., Buckley, E. G., and Dryja, T. P. (1989): Oncogenic point mutations in the human retinoblastoma gene: their application to genetic counseling. *N Engl J Med*, 321, 1689-1695.
18. Knudson, A. G., Jr., Meadows, A. T., Nichols, W. W., and Hill, R. (1976): Chromosomal deletion and retinoblastoma. *N Engl J Med*, 295, 1120-1123.

19. Cavenee, W. K., Dryja, T. P., Phillips, R. A., Benedict, W. F., Godbout, R., Gallie, B. L., Murphree, A. L., Strong, L. C., and White, R. L. (1983): Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature*, 305, 779-784.
20. Friend, S. H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R. A., Rapaport, J. M., Albert, D. M., and Dryja, T. P. (1986): A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*, 323, 643-646.
21. Bookstein, R., Lee, E. Y., To, H., Young, L. J., Sery, T. W., Hayes, R. C., Friedmann, T., and Lee, W. H. (1988): Human retinoblastoma susceptibility gene: genomic organization and analysis of heterozygous intragenic deletion mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 2210-2214.
22. Stanbridge, E. J. (1990): Human tumor suppressor genes. *Annu Rev Genet*, 24, 615-657.
23. Hu, N., Gutschman, A., Herbert, D. C., Bradley, A., Lee, W. H., and Lee, E. Y. (1994): Heterozygous Rb-1 delta 20/+mice are predisposed to tumors of the pituitary gland with a nearly complete penetrance. *Oncogene*, 9, 1021-1027.
24. Williams, B. O., Remington, L., Albert, D. M., Mukai, S., Bronson, R. T., and Jacks, T. (1994): Cooperative tumorigenic effects of germline mutations in Rb and p53. *Nat Genet*, 7, 480-484.
25. Lee, E. Y., Chang, C. Y., Hu, N., Wang, Y. C., Lai, C. C., Herrup, K., Lee, W. H., and Bradley, A. (1992): Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature*, 359, 288-294.
26. Jacks, T., Fazeli, A., Schmitt, E. M., Bronson, R. T., Goodell, M. A., and Weinberg, R. A. (1992): Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature*, 359, 295-300.
27. Clarke, A. R., Maandag, E. R., van Roon, M., van der Lugt, N. M., van der Valk, M., Hooper, M. L., Berns, A., and te Riele, H. (1992): Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature*, 359, 328-330.
28. Wang, J. Y. (1997): Retinoblastoma protein in growth suppression and death protection. *Curr Opin Genet Dev*, 7, 39-45.
29. McGee, T. L., Yandell, D. W., and Dryja, T. P. (1989): Structure and partial genomic sequence of the human retinoblastoma susceptibility gene. *Gene*, 80, 119-128.
30. Toguchida, J., McGee, T. L., Paterson, J. C., Eagle, J. R., Tucker, S., Yandell, D. W., and Dryja, T. P. (1993): Complete genomic sequence of the human retinoblastoma susceptibility gene. *Genomics*, 17, 535-543.
31. T'Ang, A., Wu, K. J., Hashimoto, T., Liu, W. Y., Takahashi, R., Shi, X. H., Mihara, K., Zhang, F. H., Chen, Y. Y., Du, C., and et al. (1989): Genomic organization of the human retinoblastoma gene. *Oncogene*, 4, 401-407.
32. Friend, S. H., Horowitz, J. M., Gerber, M. R., Wang, X. F., Bogenmann, E., Li, F. P., and Weinberg, R. A. (1987): Deletions of a DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumors: organization of the sequence and its encoded protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 9059-9063.
33. Greger, V., Passarge, E., Hopping, W., Messmer, E., and Horsthemke, B. (1989): Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet*, 83, 155-158.
34. Hong, F. D., Huang, H. J., To, H., Young, L. J., Oro, A., Bookstein, R., Lee, E. Y., and Lee, W. H. (1989): Structure of the human retinoblastoma gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 5502-5506.
35. Sakai, T., Ohtani, N., McGee, T. L., Robbins, P. D., and Dryja, T. P. (1991): Oncogenic germ-line mutations in Sp1 and ATF sites in the human retinoblastoma gene. *Nature*, 353, 83-86.

36. Mihara, K., Cao, X. R., Yen, A., Chandler, S., Driscoll, B., Murphree, A. L., T'Ang, A., and Fung, Y. K. (1989): Cell cycle-dependent regulation of phosphorylation of the human retinoblastoma gene product. *Science*, 246, 1300-1303.
37. Buchkovich, K., Duffy, L. A., and Harlow, E. (1989): The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell*, 58, 1097-1105.
38. Chen, P. L., Scully, P., Shew, J. Y., Wang, J. Y., and Lee, W. H. (1989): Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell*, 58, 1193-1198.
39. Ludlow, J. W., DeCaprio, J. A., Huang, C. M., Lee, W. H., Paucha, E., and Livingston, D. M. (1989): SV40 large T antigen binds preferentially to an underphosphorylated member of the retinoblastoma susceptibility gene product family. *Cell*, 56, 57-65.
40. Lees, J. A., Buchkovich, K. J., Marshak, D. R., Anderson, C. W., and Harlow, E. (1991): The retinoblastoma protein is phosphorylated on multiple sites by human cdc2. *Embo J*, 10, 4279-4290.
41. Weinberg, R. A. (1995): The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81, 323-330.
42. Kim, S. J., Wagner, S., Liu, F., O'Reilly, M. A., Robbins, P. D., and Green, M. R. (1992): Retinoblastoma gene product activates expression of the human TGF-beta 2 gene through transcription factor ATF-2. *Nature*, 358, 331-334.
43. Whyte, P., Buchkovich, K. J., Horowitz, J. M., Friend, S. H., Raybuck, M., Weinberg, R. A., and Harlow, E. (1988): Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature*, 334, 124-129.
44. DeCaprio, J. A., Ludlow, J. W., Figge, J., Shew, J. Y., Huang, C. M., Lee, W. H., Marsilio, E., Paucha, E., and Livingston, D. M. (1988): SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell*, 54, 275-283.
45. Hiebert, S. W. (1993): Regions of the retinoblastoma gene product required for its interaction with the E2F transcription factor are necessary for E2 promoter repression and pRb-mediated growth suppression. *Mol Cell Biol*, 13, 3384-3391.
46. Welch, P. J. and Wang, J. Y. (1993): A C-terminal protein-binding domain in the retinoblastoma protein regulates nuclear c-Abl tyrosine kinase in the cell cycle. *Cell*, 75, 779-790.
47. Xiao, Z. X., Chen, J., Levine, A. J., Modjtahedi, N., Xing, J., Sellers, W. R., and Livingston, D. M. (1995): Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature*, 375, 694-698.
48. Lohmann, D. R. (1999): RB1 gene mutations in retinoblastoma. *Hum Mutat*, 14, 283-288.
49. Richter, S., Vandezande, K., Chen, N., Zhang, K., Sutherland, J., Anderson, J., Han, L., Panton, R., Branco, P., and Gallie, B. (2003): Sensitive and efficient detection of RB1 gene mutations enhances care for families with retinoblastoma. *Am J Hum Genet*, 72, 253-269.
50. Houdayer, C., Gauthier-Villars, M., Lauge, A., Pages-Berhouet, S., Dehainault, C., Caux-Moncoutier, V., Karczynski, P., Tosi, M., Doz, F., Desjardins, L., Couturier, J., and Stoppa-Lyonnet, D. (2004): Comprehensive screening for constitutional RB1 mutations by DHPLC and QMPSF. *Hum Mutat*, 23, 193-202.
51. Zhu, X., Dunn, J. M., Goddard, A. D., Squire, J. A., Becker, A., Phillips, R. A., and Gallie, B. L. (1992): Mechanisms of loss of heterozygosity in retinoblastoma. *Cytogenet Cell Genet*, 59, 248-252.

52. Hagstrom, S. A. and Dryja, T. P. (1999): Mitotic recombination map of 13cen-13q14 derived from an investigation of loss of heterozygosity in retinoblastomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 2952-2957.
53. Ohtani-Fujita, N., Dryja, T. P., Rapaport, J. M., Fujita, T., Matsumura, S., Ozasa, K., Watanabe, Y., Hayashi, K., Maeda, K., Kinoshita, S., Matsumura, T., Ohnishi, Y., Hotta, Y., Takahashi, R., Kato, M. V., Ishizaki, K., Sasaki, M. S., Horsthemke, B., Minoda, K., and Sakai, T. (1997): Hypermethylation in the retinoblastoma gene is associated with unilateral, sporadic retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 98, 43-49.
54. Klutz, M., Horsthemke, B., and Lohmann, D. R. (1999): RB1 gene mutations in peripheral blood DNA of patients with isolated unilateral retinoblastoma. *Am J Hum Genet*, 64, 667-668.
55. Lohmann, D. R. and Gallie, B. L. (2004): Retinoblastoma: revisiting the model prototype of inherited cancer. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 129, 23-28.
56. Allderice, P. W., Davis, J. G., Miller, O. J., Klinger, H. P., Warburton, D., Miller, D. A., Allen, F. H., Jr., Abrams, C. A., and McGilvray, E. (1969): The 13q-deletion syndrome. *Am J Hum Genet*, 21, 499-512.
57. Brown, S., Russo, J., Chitayat, D., and Warburton, D. (1995): The 13q- syndrome: the molecular definition of a critical deletion region in band 13q32. *Am J Hum Genet*, 57, 859-866.
58. Horsthemke, B., Brandt, B., Albrecht, B., and Passarge, E. (1992): Deletion in one allele and a rare neutral DNA alteration in the other allele of the RB1 gene in a patient with bilateral retinoblastoma. *Am J Med Genet*, 44, 255.
59. Lohmann, D. R., Brandt, B., Oehlschlager, U., Gottmann, E., Hopping, W., Passarge, E., and Horsthemke, B. (1995): Molecular analysis and predictive testing in retinoblastoma. *Ophthalmic Genet*, 16, 135-142.
60. White, M. B., Carvalho, M., Derse, D., O'Brien, S. J., and Dean, M. (1992): Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms. *Genomics*, 12, 301-306.
61. Lohmann, D. R., Funk, A., Niedermeyer, H. P., Haupel, S., and Hofler, H. (1993): Identification of p53 gene mutations in gastrointestinal and pancreatic carcinoids by nonradioisotopic SSCA. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 64, 293-296.
62. Xiao, W. and Oefner, P. J. (2001): Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mutat*, 17, 439-474.
63. Lohmann, D. R., Gerick, M., Brandt, B., Oelschlager, U., Lorenz, B., Passarge, E., and Horsthemke, B. (1997): Constitutional RB1-gene mutations in patients with isolated unilateral retinoblastoma. *Am J Hum Genet*, 61, 282-294.
64. Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., and Williams, P. M. (1996): Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 6, 986-994.
65. Gibson, U. E., Heid, C. A., and Williams, P. M. (1996): A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*, 6, 995-1001.
66. Livak, K. J., Flood, S. J., Marmaro, J., Giusti, W., and Deetz, K. (1995): Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl*, 4, 357-362.
67. Bremner, R., Du, D. C., Connolly-Wilson, M. J., Bridge, P., Ahmad, K. F., Mostachfi, H., Rushlow, D., Dunn, J. M., and Gallie, B. L. (1997): Deletion of RB exons 24 and 25 causes low-penetrance retinoblastoma. *Am J Hum Genet*, 61, 556-570.
68. Herzog, S., Lohmann, D. R., Buiting, K., Schuler, A., Horsthemke, B., Rehder, H., and Rieder, H. (2001): Marked differences in unilateral isolated retinoblastomas from young and older children studied by comparative genomic hybridization. *Hum Genet*, 108, 98-104.

69. Kloss, K., Wahrisch, P., Greger, V., Messmer, E., Fritze, H., Hopping, W., Passarge, E., and Horsthemke, B. (1991): Characterization of deletions at the retinoblastoma locus in patients with bilateral retinoblastoma. *Am J Med Genet*, 39, 196-200.
70. Dryja, T. P., Mukai, S., Petersen, R., Rapaport, J. M., Walton, D., and Yandell, D. W. (1989): Parental origin of mutations of the retinoblastoma gene. *Nature*, 339, 556-558.
71. Dryja, T. P., Rapaport, J., McGee, T. L., Nork, T. M., and Schwartz, T. L. (1993): Molecular etiology of low-penetrance retinoblastoma in two pedigrees. *Am J Hum Genet*, 52, 1122-1128.
72. Hashimoto, T., Takahashi, R., Yandell, D. W., Xu, H. J., Hu, S. X., Gunnell, S., and Benedict, W. F. (1991): Characterization of intragenic deletions in two sporadic germinal mutation cases of retinoblastoma resulting in abnormal gene expression. *Oncogene*, 6, 463-469.
73. Kato, M. V., Ishizaki, K., Toguchida, J., Kaneko, A., Takayama, J., Tanooka, H., Kato, T., Shimizu, T., and Sasaki, M. S. (1994): Mutations in the retinoblastoma gene and their expression in somatic and tumor cells of patients with hereditary retinoblastoma. *Hum Mutat*, 3, 44-51.
74. Connolly, M. J., Payne, R. H., Johnson, G., Gallie, B. L., Allderdice, P. W., Marshall, W. H., and Lawton, R. D. (1983): Familial, EsD-linked, retinoblastoma with reduced penetrance and variable expressivity. *Hum Genet*, 65, 122-124.
75. Zajacsek, S., Jakubowska, A., Gorski, B., Kurzawski, G., Krzystolik, Z., and Lubinski, J. (1999): Frequency and nature of germline Rb-1 gene mutations in a series of patients with sporadic unilateral retinoblastoma. *Eur J Cancer*, 35, 1824-1827.
76. Zajacsek, S., Jakubowska, A., Kurzawski, G., Krzystolik, Z., and Lubinski, J. (1998): Age at diagnosis to discriminate those patients for whom constitutional DNA sequencing is appropriate in sporadic unilateral retinoblastoma. *Eur J Cancer*, 34, 1919-1921.
77. Ata-ur-Rasheed, M., Vemuganti, G., Honavar, S., Ahmed, N., Hasnain, S., and Kannabiran, C. (2002): Mutational analysis of the RB1 gene in Indian patients with retinoblastoma. *Ophthalmic Genet*, 23, 121-128.
78. Francke, U. and Kung, F. (1976): Sporadic bilateral retinoblastoma and 13q-chromosomal deletion. *Med Pediatr Oncol*, 2, 379-385.
79. Albrecht, P., Ansperger-Rescher, B., Schöler, A., Zeschnigk, M., Gallie, B., and Lohmann, D. R. (2005): Spectrum of gross deletions and insertions in the RB1 gene in patients with retinoblastoma and association with phenotypic expression. *Hum Mutat*, 26, 437-445.
80. Horsthemke, B., Barnert, H. J., Greger, V., Passarge, E., and Hopping, W. (1987): Early diagnosis in hereditary retinoblastoma by detection of molecular deletions at gene locus. *Lancet*, 1, 511-512.
81. Matsunaga, E. (1980): Retinoblastoma: host resistance and 13q- chromosomal deletion. *Hum Genet*, 56, 53-58.
82. Bunin, G. R., Emanuel, B. S., Meadows, A. T., Buckley, J. D., Woods, W. G., and Hammond, G. D. (1989): Frequency of 13q abnormalities among 203 patients with retinoblastoma. *J Natl Cancer Inst*, 81, 370-374.
83. Lohmann, D. R., Brandt, B., Hopping, W., Passarge, E., and Horsthemke, B. (1994): Spectrum of small length germline mutations in the RB1 gene. *Hum Mol Genet*, 3, 2187-2193.
84. Lohmann, D. R., Brandt, B., Hopping, W., Passarge, E., and Horsthemke, B. (1996): The spectrum of RB1 germ-line mutations in hereditary retinoblastoma. *Am J Hum Genet*, 58, 940-949.
85. Albrecht, P., Bode, J., Buiting, K., Prashanth, A. K., and Lohmann, D. R. (2004): Recurrent deletion of a region containing exon 24 of the RB1 gene caused by non-

- homologous recombination between a LINE-1HS and MER21B element. *J Med Genet*, 41, e122.
86. Chuzhanova, N., Abeysinghe, S. S., Krawczak, M., and Cooper, D. N. (2003): Translocation and gross deletion breakpoints in human inherited disease and cancer II: Potential involvement of repetitive sequence elements in secondary structure formation between DNA ends. *Hum Mutat*, 22, 245-251.
 87. Kazazian, H. H., Jr. and Goodier, J. L. (2002): LINE drive. retrotransposition and genome instability. *Cell*, 110, 277-280.
 88. Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczy, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J. P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J. C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Hillier, L. W., McPherson, J. D., Marra, M. A., Mardis, E. R., Fulton, L. A., Chinwalla, A. T., Pepin, K. H., Gish, W. R., Chisoe, S. L., Wendl, M. C., Delehaunty, K. D., Miner, T. L., Delehaunty, A., Kramer, J. B., Cook, L. L., Fulton, R. S., Johnson, D. L., Minx, P. J., Clifton, S. W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J. F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R. A., Muzny, D. M., Scherer, S. E., Bouck, J. B., Sodergren, E. J., Worley, K. C., Rives, C. M., Gorrell, J. H., Metzker, M. L., Naylor, S. L., Kucherlapati, R. S., Nelson, D. L., Weinstock, G. M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D. R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H. M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R. W., Federspiel, N. A., Abola, A. P., Proctor, M. J., Myers, R. M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D. R., Olson, M. V., Kaul, R., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G. A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B. A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W. R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blocker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J. A., Bateman, A., Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D. G., Burge, C. B., Cerutti, L., Chen, H. C., Church, D., Clamp, M., Copley, R. R., Doerks, T., Eddy, S. R., Eichler, E. E., Furey, T. S., Galagan, J., Gilbert, J. G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L. S., Jones, T. A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W. J., Kitts, P., Koonin, E. V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T. M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J. V., Mulder, N., Pollara, V. J., Ponting, C. P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A. F., Stupka, E., Szustakowski, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y. I., Wolfe, K. H., Yang, S. P., Yeh, R. F., Collins, F., Guyer, M. S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K. A., Patrinos, A., Morgan, M. J., Szustakowski, J., de Jong, P., Catanese, J. J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S. and Chen, Y. J. (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409, 860-921.

89. Gilbert, N., Lutz-Prigge, S., and Moran, J. V. (2002): Genomic deletions created upon LINE-1 retrotransposition. *Cell*, 110, 315-325.
90. Symer, D. E., Connelly, C., Szak, S. T., Caputo, E. M., Cost, G. J., Parmigiani, G., and Boeke, J. D. (2002): Human L1 retrotransposition is associated with genetic instability in vivo. *Cell*, 110, 327-338.
91. Bode, J., Benham, C., Ernst, E., Knopp, A., Marschalek, R., Strick, R., and Strissel, P. (2000): Fatal connections: when DNA ends meet on the nuclear matrix. *J Cell Biochem Suppl*, Suppl 35, 3-22.
92. Benham, C., Kohwi-Shigematsu, T., and Bode, J. (1997): Stress-induced duplex DNA destabilization in scaffold/matrix attachment regions. *J Mol Biol*, 274, 181-196.
93. Bode, J., Goetze, S., Heng, H., Krawetz, S. A., and Benham, C. (2003): From DNA structure to gene expression: mediators of nuclear compartmentalization and dynamics. *Chromosome Res*, 11, 435-445.
94. Bode, J., Kohwi, Y., Dickinson, L., Joh, T., Klehr, D., Mielke, C., and Kohwi-Shigematsu, T. (1992): Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix-associating DNAs. *Science*, 255, 195-197.
95. Goetze, S., Huesemann, Y., Baer, A., and Bode, J. (2003): Functional characterization of transgene integration patterns by halo fluorescence in situ hybridization: electroporation versus retroviral infection. *Biochemistry*, 42, 7035-7043.
96. Vanin, E. F., Henthorn, P. S., Kioussis, D., Grosveld, F., and Smithies, O. (1983): Unexpected relationships between four large deletions in the human beta-globin gene cluster. *Cell*, 35, 701-709.
97. Chuzhanova, N. A., Anassis, E. J., Ball, E. V., Krawczak, M., and Cooper, D. N. (2003): Meta-analysis of indels causing human genetic disease: mechanisms of mutagenesis and the role of local DNA sequence complexity. *Hum Mutat*, 21, 28-44.
98. Noorani, H. Z., Khan, H. N., Gallie, B. L., and Detsky, A. S. (1996): Cost comparison of molecular versus conventional screening of relatives at risk for retinoblastoma. *Am J Hum Genet*, 59, 301-307.

7. ANHANG

7.1 Abkürzungen und Glossar

A	Adenosin
Annealing	Hybridisieren der Primer an die Template-DNA während der PCR
BCR	Breakpoint Cluster Region; Regionen mit erhöhter Bruchpunktfrequenz
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
C-terminal	Carboxy-terminal (Carboxy-Ende)
Cycling	Abfolge der unterschiedlichen Temperaturschritte während der PCR-Zyklen
Cluster	Anhäufung
Ct	Cycle at Threshold; PCR Zyklus bei dem das Fluoreszenzsignal in der Realtime PCR den Schwellenwert erreicht
Del	Deletion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonucleotide
Downstream	In 3'-Richtung eines Gens
Elongation	DNA-Synthese durch die Taq-Polymerase während der PCR
EDTA	(Englisch) ethylene diamine tetraacetic acid (Äthylendiamintetraessigsäure)
FAM	5-Carboxy-Fluorescein
Frameshift	Verschiebung des offenen Leserahmens (open reading frame, von Start- zu Stop-Codon) durch Insertion oder Deletion einer nicht durch 3 teilbaren Anzahl an Basenpaaren
G	Guanin
<i>gross deletions</i>	Deletionen von mehr als 20 Basenpaaren (Nomenklatur der Human Gene Mutation Database)
h	Stunde (hour)
housekeeping Gene	Für die Aufrechterhaltung basaler Zellfunktionen nötige Gene, die im Allgemeinen in konstantem Ausmaß transkribiert werden
Ins	Insertion
LOH	Loss of heterozygosity (Verlust konstitutioneller Heterozygotie)
Longrange-PCR	Polymerasekettenreaktion, deren Produkt mehrere Kilobasen umfasst
PCR	Polymerasekettenreaktion

Primer	Oligonucleotide, die bei der PCR als Ursprung für die Amplifikation dienen (Sense Primer = Primer am 5'-Ende des Produkts, Antisense Primer = Primer am 3'-Ende des Produkts)
Signalintegral	Fläche unter der Kurve der Fluoreszenzsignale bei der Auswertung der QMPX-PCR
QMPX-PCR	Quantitative Multiplex Polymerasekettenreaktion, bei der mehrere Produkte in der gleichen Reaktion amplifiziert werden
RNA	Ribonukleinsäure
Min	Minute
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
ROH	Retention of heterozygosity (Konservierung konstitutioneller Heterozygotie)
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin
Sec	Sekunde
Single Strand DNA	Einzelsträngige DNA
SSCP	single stranded DNA conformation polymorphism (Einzelstrang-DNA-Konformationspolymorphismus)
STR	Short tandem repeat (Wiederholung kurzer, identisch zusammengesetzter DNA-Sequenzen in Tandem-Anordnung)
T	Thymin
TAMRA	N'-Tetramethyl-6-Carboxyrhodamin
Template	DNA, die während der PCR als Matrize dient
Threshold	Schwellenwert
Upstream	In 5'-Richtung eines Gens

7.2 Danksagung

Für die Möglichkeit, diese Arbeit zu erstellen, danke ich Herrn Prof. Dr. Dietmar Lohmann. Insbesondere möchte ich ihm herzlichst für die umfassende Einführung in die Molekulargenetik, seine ständige wissenschaftliche und moralische Unterstützung sowie für seine unzähligen Erklärungen, Ratschläge und Ideen danken.

Mein besonderer Dank gilt auch allen Patienten und ihren Eltern, ohne deren Einverständnis diese Arbeit nicht hätte durchgeführt werden können.

Frau Dr. Karin Buiting danke ich sehr für die wertvollen Diskussionen über die möglichen Entstehungsmechanismen von *gross deletions*.

Frau Birgit Ansperger danke ich herzlich für die tatkräftige Unterstützung bei der Untersuchung der letzten Proben dieser Arbeit.

Für seine Hilfe bei der Entwicklung der Realtime-PCR Assays danke ich Dr. Michael Zeschnigk.

Mein Dank gilt Herrn Dr. Stefan Böhringer für seine Ratschläge zur statistischen Auswertung der quantitativen Multiplex-PCR.

Ganz herzlich möchte ich auch allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik für die stets freundliche und angenehme Atmosphäre (in und außerhalb des Labors) sowie für die allseitige Hilfsbereitschaft danken.

Dem IFORES-Programm zur intramuralen Promotionsförderung der Universität Duisburg-Essen danke ich für die Bereitstellung der Mittel für diese Arbeit.

Ganz besonders möchte ich auch meinen Eltern und meiner Freundin Alexandra Guiré danken, ohne deren jahrelange unermüdliche Unterstützung dies nicht möglich gewesen wäre.

7.3 Lebenslauf

Name: Philipp, Moritz Albrecht
Geburtsdatum: 06.06.1977
Geburtsort: Köln
Wohnort: Essen
Familienstand: ledig

Schulen und Abschlüsse

1984 – 1988 Grundschole an der Waldlehne in Essen
1988 – 1994 Gymnasium Luisenschule in Essen
1994 – 1995 High-School in Lawrenceville, Illinois, in den USA im Rahmen eines einjährigen Rotary-Austauschstipendiums
1995 – 1997 Gymnasium Luisenschule in Essen
26.05.1997 Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Zivildienst

1997 – 1998 Krankenpflege im Alfried Krupp Krankenhauses in Essen

Universitäre Ausbildung

WS 1998 – SS 2001 Studium der Humanmedizin an der Albert Ludwig Universität in Freiburg im Breisgau
06.09.2000 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
17.09.2001 Erstes Staatsexamen
WS 2001 – SS 2002 1-jähriges Auslandsstudium an der Université Paris XI, le Kremlin Bicêtre, im Rahmen eines Sokrates/Erasmus Austausch-Stipendiums
WS 2002 – WS 2004 Beendigung des Medizinstudiums an der Universität Duisburg-Essen
01.04.2004 zweites Staatsexamen
2004 – 2005 Praktisches Jahr: Erstes Tertial in Montreux in der Schweiz, die beiden letzten Tertiale im Alfried Krupp Krankenhaus in Essen

02.05.2005

Drittes Staatsexamen (Ärztliche Prüfung)

Ärztliche Laufbahn

17.05.2005

Approbation als Arzt

Seit 01.07.2005

Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Assistenzarzt in
der neurologischen Klinik des Universitätsklinikums
Düsseldorf

7.4 Kopien der veröffentlichten Arbeiten

7.4.1 Anlage 1

Albrecht, P., Ansperger-Rescher, B., Schüler, A., Zeschnigk, M., Gallie, B., and Lohmann, D. R. (2005): Spectrum of gross deletions and insertions in the RB1 gene in patients with retinoblastoma and association with phenotypic expression. Hum Mutat, 26, 437-445.

7.4.2 Anlage 2

Albrecht, P., Bode, J., Buiting, K., Prashanth, A. K., and Lohmann, D. R. (2004): Recurrent deletion of a region containing exon 24 of the RB1 gene caused by non-homologous recombination between a LINE-1HS and MER21B element. J Med Genet, 41, e122.